JÉSSICA BORGHESI

**Interação entre células tronco de membrana amniótica e tumor mamário
canino *in vitro***

São Paulo

2019

JÉSSICA BORGHESI

**Interação entre células tronco de membrana amniótica e tumor mamário
canino *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron

Coorientadora:

Prof. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira

São Paulo

2019

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3757
FMVZ

Borghesi, Jéssica
Interação entre células tronco de membrana amniótica e tumor mamário canino *in vitro*
/ Jéssica Borghesi. – 2019.
152 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron.

Coorientadora: Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira.

1. Câncer de mama canino. 2. Células-tronco. 3. Doxorubicina. 4. Membrana amniótica.
5. Neoplasia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Interação entre células tronco de membrana amniótica e tumor mamário canino [in vitro]", protocolada sob o CEUA nº 9077100215, sob a responsabilidade de **Phelipe de Oliveira Favaron** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/05/2018.

We certify that the proposal "Interaction between stem cells from amniotic membrane and canine mammary tumor "in vitro", utilizing 32 Dogs (32 females), protocol number CEUA 9077100215, under the responsibility of **Phelipe de Oliveira Favaron** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2015** a **03/2018**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de campanha**

Espécie: **Cães**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 15 anos**

N: **32**

Linhagem: **SRD**

Peso: **5 a 30 kg**

Resumo: Células-tronco tumorais são definidos por sua incapacidade de diferenciar, de alta atividade e replicação são responsáveis pelo início, manutenção e disseminação do tumor. Após o aparecimento de células estaminais de um tumor num sistema do corpo continuam a replicar a criação de pelo menos dois tipos de células: um tipo de população de células que mantém estes renovar células autor e outro tipo de célula que herda só a capacidade de se diferenciar em células tumorais, mas que faz não têm a capacidade de manter e suportar o desenvolvimento de um tumor. Tumores na glândula mamária canina é o câncer mais comum em cães. Este tipo de tumor em cães é muito parecida com a humana mais a sua taxa de incidência é três vezes mais elevada do que em mulheres. A membrana amniótica para ser originada epiblasto, tem, assim, alta pluripotência potencial. No entanto, a aplicação potencial de membrana amniótica de células, não só é a característica da pluripotência, mas também o seu carácter imunogénico. O uso de células amnióticas de membrana para o tratamento de certas doenças demonstram boa terapêutico e sem efeitos colaterais ou toxicidade resultados. Portanto, o objetivo do nosso trabalho é tratar células tumorais caninas com células da membrana amniótica associados à quimioterapia

Local do experimento: Todos os experimentos serão realizados no laboratório de cultivo celular do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP.

São Paulo, 23 de maio de 2018

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traidi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BORGHESI, Jéssica

Título: **Interação entre células tronco de membrana amniótica e tumor mamário canino**
in vitro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico essa vitória a minha mãe **Rita Borghesi** e minha avó **Maria Carolina Borghesi**, por desde criança me ensinar que educação é o único bem que jamais poderá ser tirados de nós.*

Por sempre acreditar, dedicar e apoiar os meus sonhos. Este foi mais um deles.

*Ao meu namorado **Pedro Henrique**, o qual pacientemente me apoio nesses últimos anos.*

*E ao grande amor da minha vida, meu “bebê de quatro patas” **Belinha**, que me acompanha todos anos.*

E a todos os animais que infelizmente devido a sua doença participaram deste trabalho, todo meu RESPEITO e AMOR por vocês.

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, e sempre a **DEUS**....*

A minha família que sempre me apoio e entendeu que cada ausência era necessária para a realização desta vitória.

*Ao meu orientador **Dr.Phelipe Oliveira Favaron**, que desde do principio sempre esteve disposto a compartilhar seus conhecimentos, **MUITO OBRIGADA**.*

*A minha co-orientadora, **Dra Ana Claudia Oliveira** não existe uma palavra para definir a gratidão que sinto por tudo que você fez por mim e para a realização deste trabalho nestes últimos anos. A personificação de uma profissional integra e gentil, a qual sempre esta dispostas a ajudar em tudo e a todos, **MUITO OBRIGADA**.*

*A professora **Dra. Maria Angelica Miglino**, por toda a confiança depositada nos últimos anos, por sempre acreditar que era possível e sempre incentivar novas jornadas. A sua perseverança e determinação como profissional é admirável, **MUITO OBRIGADA**.*

*Aos meus tutores no exterior **Dr. Juan Carlos Illera e Dra. Maria Josefina Illera** pela disponibilidade, gentileza e toda ajuda em todo meu estagio, **MUITO OBRIGADA**.*

*A minha eterna e querida orientadora (de iniciação científica) **Dra. Ana Flavia Carvalho**, se hoje tudo isso é possível é graças você ter acreditado que eu era capaz e conseguiria, **MUITO OBRIGADA**.*

*Ao coordenador do programa **Dr. José Roberto Kfuory**, pela disponibilidade em ajudar.*

*Aos técnicos **Ronaldo e Rose Eli**, sempre dispostos em ajudar.*

*As secretarias **Daura e Jaqueline**, que sempre nos auxiliam na melhor forma proceder com nossa situação na pos-graduação.*

Ao colegas de laboratórios: Cesar Prado, Marcio Pereira, Carla Maria, João Leite e Arthur(Gaúcho).

Aos amigos e companheiros de jornada: Paula Fratini, Gustavo Matias, Rodrigo Barreto e Tais Sasahara, obrigada por todos os bons e maus momentos compartilhados.

As minha queridas e eternas alunas de IC Marcella Kato e Mariana Ferreira, vocês foram fundamentais para a fabricação deste trabalho, foi um prazer compartilhar conhecimento com vocês.

As minhas alunas de IC agregadas Maira e Ana, sempre dispostas a juda.

Ao grupo mais elitizado da anatomia, o grupo Anatomie Personnalité (Katia, Natal, Paulo, Marção, Luciana, Luciano, Ana Lidia, Adriana, Fausto, Ju, Lara, Hayashi, Ana Carol, Miguel e Carol Forbes) a jornada com a presença de vocês se tornou mais fácil e agradável.

Um agradecimento especial aos queridos amigos:

Katia Guimarães, uma pessoa com um caracter e sinceridade admirável. Uma parte deste trabalho não teria sido feita sem você.

Franceliusa Delys (Natal), eiii coisinha muito obrigada por sempre “topar todas as minha loucuras” e sempre me dizer que vai dar certo. No fim não é que deu...

Ana Carol, digamos que começamos errado e terminamos certo..rsrsr. Muito obrigada por todas as vezes que você deixou de fazer suas coisas para me socorrer em experimentos e analises. Chegou bem no finalzinho do meu doutorado, mas se tornou uma amiga muito especial.

Rafael Hayashi, meu irmão de pós graduação, “uma pessoa imposta na minha vida” que aprendi a gostar, a respeita e acima de tudo admirar como pessoa e profissional. Uma pessoa com uma qualidade rara nos dias de hoje GENEROSIDADE, nunca mediu esforço em me ajudar.

*E finalmente **Lara Carolina e Adriana** pessoas fundamentais e essências que me fizeram conseguir chegar até o fim desta jornada. Vocês me derão apoio profissional e emocional em todos os momentos destes últimos anos, com certeza sem vocês nada disso seria possível, MUITO OBRIGADA.*

Me encantaría hacer un agradecimiento especial a todos los miembros del equipo de profesionales, del cual fui parte y me siento honrada de haber podido participar en la Universidad Complutense de Madrid, en especial:

***Profesor Juan Carlos Illera**, gracias por la confianza y oportunidad de permitirme pertenecer a su equipo de trabajo y lograr aprender mucho con ustedes, en realidad fue una experiencia única.*

***Profesora Maria Josefina Illera**, no tengo palabras para agradecer por todo lo que hizo por mi en esos meses que convivimos. Profesionalmente, la considero una excelente profesora , pero principalmente como una persona generosa, que me recibió y me enseñó lo lindo que es España.*

***Profesora Gema Silvan**, gracias por toda la ayuda y enseñanzas en los análisis hormonales.*

***Profesora Laura Peña**, le agradezco por poner a disposición las células IPC-366.*

***Sara Cáceres**, a pesar del poco tiempo que estuvimos en contacto, recibí muchas enseñanzas nuevas. Muchas gracias por permitirme utilizar el linaje de IPC-366 en mi tesis.*

***Angela Alonso**, con seguridad sin tí, no hubiera podido lograr estar lejos de casa y de los amigos en esos meses que pasé en España, te convertiste en una compañera de laboratorio y una amiga, GRACIAS.*

*A **Carmem**, gracias por todas las enseñanzas y ayuda con los ratones y por los buenos momentos en el laboratorio, principalmente con aquellos perritos tan lindos...*

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

A Capes pelo auxílio da bolsa no Brasil, e ao programa PDSE pelo financiamento no exterior.

*“Os cães vivem menos, porque já nascem sabendo amar de um jeito que
levamos a vida inteira para aprender”*

RESUMO

BORGHESI, J. **Interação entre células tronco de membrana amniótica e tumor mamário canino *in vitro***. 2019. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Tumores nas glândulas mamárias caninas representam a neoplasia mais comum em cadelas. Este tipo de tumor em cadelas é muito semelhante quanto ao comportamento biológico, resposta a agentes citotóxicos e características histológicas comparadas aos tumores apresentados em humanos, mas sua taxa de incidência é três vezes maior que em mulheres. Em relação aos tratamentos, muitas vezes é necessária a utilização da quimioterapia para erradicar metástases, no entanto, a maioria dos tumores caninos é apenas moderadamente sensível à quimioterapia. Nesse contexto, o atual cenário favorece ensaios terapêuticos pré-clínicos e pesquisas voltadas para novos tratamentos anti-câncer. Nesse sentido, o uso de células-tronco amnióticas tem se destacado neste campo. Desta forma, caracterizamos células de membrana amniótica canina, onde verificamos que estas apresentavam expressão para marcadores de células mesenquimais. Além disso, apresentaram capacidade de diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e, quando injetadas *in vivo*, não apresentaram potencial tumorigênico. Posteriormente, avaliamos a matriz extracelular de carcinomas mamários canino do tipo tubular e sólido. Verificamos que o carcinoma sólido apresentou maior grau de malignidade devido a suas características histológicas e com os componentes presentes em sua matriz extracelular. Por fim, avaliamos os efeitos do tratamento com doxorrubicina (DOXO) em associação com células-tronco de membrana amniótica canina (AMC) sobre células de carcinoma inflamatório mamário canino (IPC-366), e células de carcinoma sólido mamário canino (TCM). Para isso, quatro grupos experimentais foram analisados: grupo controle sem tratamento; grupo I com DOXO, grupo II com AMC e grupo III associação de DOXO com AMC. Verificamos que nas células IPC-366, o grupo associação de DOXO com AMC em células apresentou melhores resultados em relação à redução do crescimento celular e na expressão de proteínas relacionadas à proliferação e angiogênese. Já nas células TCM verificamos que o tratamento com células AMC, sendo ou não associada à DOXO, possui a capacidade de prender as células no ciclo celular na fase de repouso fazendo com que as mesmas apresentem redução em seu crescimento e proliferação celular.

Palavras-chave: Câncer de mama canino. Células-tronco. Doxorrubicina. Membrana amniótica. Neoplasia.

ABSTRACT

BORGHESI, J. **Interaction between stem cells from amniotic membrane and canine mammary tumor *in vitro***. 2019. 152 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The tumors on the canine mammary glands represent the most common neoplasm in bitches. This type of tumor in bitches responds to cytotoxic agents in a very similar biological way when compared to tumors presented in humans. Besides that, they have the same histological characteristics, but its incidence rate is three times higher in bitches than in women. Regarding treatments, chemotherapy is often required to eradicate metastases, however, most canine tumors are only moderately sensitive to chemotherapy. In this context, the current scenario favors pre-clinical therapeutic trials and research aimed at new anticancer treatments. In this sense, the use of amniotic stem cells has been outstanding in this field. So, we characterized canine amniotic membrane cells. At this characterization we verified that they had expression for markers of mesenchymal cells, and present differentiation capacity in osteogenic, adipogenic and chondrogenic lines. When injected *in vivo*, did not present tumorigenic potential. Subsequently, we evaluated the extracellular matrix of canine mammary carcinomas of the tubular and solid type. We verified that solid carcinoma showed a higher degree of malignancy due to its histological characteristics and the components present in its extracellular matrix. Finally, we evaluated the effects of doxorubicin treatment (DOXO) in combination with canine amniotic membrane (AMC) stem cells on canine mammary inflammatory carcinoma cells (IPC-366), and solid canine mammary carcinoma cells. For this, four experimental groups were analyzed: control group without treatment; group I with DOXO, group II with AMC and group III association of DOXO with AMC. We found that at the IPC-366 cells, the association group of DOXO with AMC in cells presented better results regarding to the reduction of cell growth and expression of proteins related to proliferation and angiogenesis. In the TCM cells, we found that treatment with AMC cells, whether associated with DOXO, can bind the cells in the cell cycle during the resting phase, promoting the cell growth decrease and proliferation.

Keywords: Amniotic membrane. Canine breast cancer. Doxorubicin. Neoplasm. Stem cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVO.....	18
2.2. Objetivo Geral.....	18
2.3. Objetivos Especificos.....	18
3. Artigo I - Câncer de Mama Humano e Canino: O estado da Arte da Terapia e Novas Abordagens.....	20
3.1 INTRODUÇÃO.....	21
3.2 PROCESSO DE CARCINOGENÊSE.....	22
3.3 MUTAÇÕES GÊNICAS NO CÂNCER DE MAMA.....	24
3.4 O PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER.....	27
3.5 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS.....	30
3.6 INCIDÊNCIA NO CÂNCER DE MAMA.....	34
3.7 FATORES HORMONAIS NO CÂNCER DE MAMA.....	36
3.8 TRATAMENTO.....	38
3.9 TRATAMENTO ALTERNATIVO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS).....	41
3.10 IMUNOMODULAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS).....	42
3.11 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA.....	43
3.12 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
4. Artigo II - Células-tronco Mesenquimais de Membrana Amniótica Canina: Isolamento, Caracterização e Diferenciação.....	66
4.1 INTRODUÇÃO.....	67
4.2 MATERIAL E METODO.....	68
4.2.1 Animais Utilizados.....	68
4.2.2 Cultura Celular de Membrana Amniótica Canina (AMC).....	68
4.2.3 Análise Morfológica.....	69
4.2.4 Criopreservação Celular.....	69
4.2.5 Citometria de Fluxo.....	69

4.2.6 Diferenciação Celular.....	70
4.2.7 Potencial Tumorigênico.....	70
4.3 RESULTADOS.....	71
4.3.1 Isolamento, Morfologia e Criopreservação de Células de Membrana Amniótica Canina.....	71
4.3.2 Imunofenotipagem.....	72
4.3.3 Ensaio de Diferenciação Celular.....	76
4.3.4 Ensaio Do Potencial Tumorigênico.....	76
4.4 DISCUSSÃO.....	77
4.5 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
5. Artigo III - O Papel da Matriz Extracelular no Carcinoma Mamário Tubular e Sólido.....	86
5.1 INTRODUÇÃO.....	87
5.2 MATERIAL E METODO.....	88
5.2.1 Animais.....	88
5.2.2 Análise Histopatológica.....	88
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	89
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	89
5.2.5 Imunohistoquímica.....	89
5.3 RESULTADOS	90
5.3.1 Classificação Histopatológica.....	90
5.3.2 Avaliação da Arquitetura das Fibras de Colágeno.....	91
5.3.3 Análise Ultraestrutural.....	92
5.3.4 Análise Imunohistoquímica.....	94
5.4 DISCUSSÃO.....	96
5.5 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	99
6. Artigo IV - Efeito do Tratamento de Doxorrubicina em Associação com Células-Tronco de Membrana Amniótica Sobre Células de Carcinoma Inflamatório Mamário Canino (IPC-366).....	105
6.1 INTRODUÇÃO.....	106
6.2 MATERIAL E METODO.....	107

6.2.1 Cultura Celular da Linhagem de Células de Carcinoma Inflamatório Mamário Canino (IPC-366).....	107
6.2.2 Cultura Celular das Células-Tronco da Membrana Amniótica Canina (AMC).....	108
6.2.3 Ensaio de Interação Através de Cocultura Celular.....	108
6.2.4 Determinação da Dosagem de Doxorrubicina.....	108
6.2.5 Ensaio de Metabolismo Celular (MTT).....	109
6.2.6 Análise Morfológica.....	109
6.2.7 Curva de Crescimento.....	109
6.2.8 Ciclo Celular.....	109
6.2.9 Citometria de Fluxo.....	110
6.2.10 Análise dos Hormônios Esteroides.....	110
6.2.11 Análise Estatística.....	110
6.3 RESULTADOS.....	111
6.3.1 Efeito da Doxorrubicina no Metabolismo Celular de Células IPC-366.....	111
6.3.2 Análise da Curva de Crescimento.....	111
6.3.3 Análise Morfológica.....	112
6.3.4 Análise do Ciclo Celular.....	115
6.3.5 Citometria de Fluxo.....	116
6.3.6 Concentrações de Hormônio Esteróide no Meio de Cultura.....	117
6.4 DISCUSSÃO.....	119
6.5 CONCLUSÃO.....	124
REFERÊNCIAS.....	124
7. Artigo V - Interação entre Células-Tronco de Membrana Amniótica Canina e Carcinoma Sólido Mamário Canino <i>in vitro</i>.....	129
7.1 INTRODUÇÃO.....	130
7.2 MATERIAL E METODO.....	131
7.2.1 Animais Utilizados.....	131
7.2.2 Cultura de Células de Carcinoma Sólido Mamário Canino (TCM).....	131
7.2.3 Cultura de Células-Tronco da Membrana Amniótica Canina (AMC).....	132
7.2.4 Ensaio de Interação Através de Cocultura Celular.....	132
7.2.5 Determinação da Dosagem de Doxorrubicina.....	132

7.2.6 Ensaio de Metabolismo Celular (MTT).....	133
7.2.7 Análise Morfológica.....	133
7.2.8 Curva de Crescimento.....	133
7.2.9 Ciclo Celular.....	133
7.2.10 Proliferação Celular.....	134
7.2.11 Análise Estatística.....	134
7.3 RESULTADOS.....	134
7.3.1 Ensaio do Metabolismo Celular de Células TCM.....	134
7.3.2 Análise Morfológica.....	136
7.3.3 Curva de Crescimento.....	138
7.3.4 Ciclo Celular.....	138
7.3.5 Proliferação Celular.....	140
7.4 DISCUSSÃO.....	142
7.5 CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS.....	144
8. CONCLUSÃO FINAL.....	149
REFERÊNCIAS.....	150

1. INTRODUÇÃO

O tumor mamário é a neoplasia mais comum em cadelas (LANTINGA-VAN LEEUWEN et al., 2000; DUTRA et al., 2004), da mesma forma que ocorre no ser humano. Nas cadelas, o tumor também representa um grupo heterogêneo de tumores com diversidade em seu comportamento biológico, na evolução e na resposta à terapia (MATOS et al., 2005; SEMENZA, 2015).

A maioria dos tumores mamários malignos caninos tem grande potencial para sofrer metástase, contudo, isso varia de acordo com o tipo de tumor (epitelial, mioepitelial e mesenquimal), diferenciações histológicas e fatores de prognósticos clínicos (MISDORP et al., 1999; SOBRENMO, 2003). As metástases tumorais sofrem uma série de eventos independentes que incluem o destacamento de células de tumor primário que avançam pela matriz tumoral, penetram através da membrana dos vasos linfáticos e sanguíneos atingindo a circulação formando colônias independentes em órgãos distantes do tumor primários, com seus próprios fatores de crescimento e suprimento vascular (IOACHIM, 1994; STIVAROU; PATSAVOUDI, 2015).

Dentre as características estruturais do tumor, a matriz extracelular (MEC) se caracteriza como um importante fator de análise, visto que para a saída do tumor de seu sítio de origem e chegada em outros locais do corpo é necessário que as moléculas de adesão, dentre elas a e-caderina, e as glicoproteínas como a fibronectina e laminina, sejam degradadas (WILSON et al., 1999; KERKEL; SAARIALHO-KERE, 2003).

O tratamento de câncer de mama na espécie canina baseia-se na cirurgia para remoção do tumor (com exceção apenas para o carcinoma inflamatório) e da cadeia mamária e na quimioterapia adjuvante, sendo esta realizada após o tratamento cirúrgico, com o objetivo de erradicar possíveis metástases e aumentar a sobrevida do animal (RUTTEMAN et al., 2001; KOBAYASHI; NORONHA, 2015). Os fármacos mais utilizados na quimioterapia de câncer de mama canino são os antibióticos antraciclinas e os agentes alquilantes (KARAYANNOPOULOU et al., 2001; RUTTEMAN et al., 2001). Sendo que a doxorrubicina, representante das antraciclinas, é o fármaco mais utilizado, podendo ser utilizado sozinho ou em associação (HAHN; RICHARDSON, 1995; DEVITA et al., 1997; SORENMO, 2003).

Ao contrário das células tumorais que são definidas pela sua incapacidade de diferenciação, alta atividade de replicação e responsabilidade pela iniciação, manutenção e propagação tumoral (PARDAL et al., 2003), as células tronco mesenquimais são definidas

pela sua capacidade de auto-renovação ilimitada e indiferenciação, o que lhes conferem um papel primordial durante o processo de desenvolvimento (ASAHARA; KAWAMOTO, 2004; MIMEAULT; BATRA, 2006; TROUNSON, 2006). Nos últimos anos houve um crescente interesse nos estudos de células tronco fetais, que são células derivadas de tecidos extraembrionários, segundo a nova classificação. Dentre as células de tecidos extraembrionários podemos destacar as derivadas de membrana amniótica, as quais apresentam grande capacidade de proliferação e expansão *in vitro* (MIKI et al., 2005; FERNANDES et al., 2012; MASSEE et al., 2015; FATIA et al., 2016), e por se encontrarem na interface materno fetal apresentam característica imunogênica tornando-se propícia para transplantes (LI et al., 2005; WOLBANK et al., 2007; MARCUS; WOODBURY, 2008). Além disso, apresentam também uma inerente capacidade para migrar em locais que apresentam inflamação, lesão, isquemia e o mais importante, microambiente tumoral (MOMIN et al., 2010).

Devido a todas as características mencionadas acima as células-tronco mesenquimais têm sido estudadas e avaliadas quanto ao seu potencial no tratamento de tumores, uma vez que, principalmente, no câncer de mama tanto humano quanto canino, os tratamentos existentes atualmente não apresentam uma ação totalmente efetiva, com variáveis taxas de cura e muitos efeitos adversos (BONILLA et al., 2017). Sendo assim, o transplante de células tronco acaba sendo uma boa alternativa de tratamento, já que estudos sugerem que células- tronco exercem efeito antitumoral (ANDERSON et al., 2000). Com essas informações nós hipotetizamos que as células-tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica associadas à doxorrubicina tem capacidade de modular os efeitos dos tumores mamários em seu microambiente.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de isolamento, diferenciação e potencial tumorigênico de membrana amniótica canina *in vitro* em diferentes períodos gestacionais. Além disso, caracterizar morfológicamente e histogeneticamente a matriz extracelular de carcinoma sólido e tubular mamário canino para melhor entendimento de como as células tumorais migram pela sua matriz. E por fim avaliar o tratamento *in vitro* de células de carcinoma inflamatório e carcinoma sólido mamário canino mediante a associação de células de membrana amniótica canina e doxorrubicina.

2.2. Objetivos Específicos

Artigo I

-Realizar uma revisão bibliográfica de análise comparativa sobre as principais características morfológicas, histopatológicas e moleculares, bem como os tratamentos atuais e alternativos existentes nos tumores mamário humano e canino.

Artigo II

- Cultivar células de membrana amniótica canina entre 30-55 dias gestacionais, afim de, verificar sua capacidade de proliferação e expansão *in vitro*; assim como a expressão de proteínas relacionadas a células mesenquimais, de proliferação celular e de resposta imunológica; e por fim avaliar a capacidade destas células formarem tumores quando injetadas *in vivo* em camundongos imunossuprimidos (Balb/c nude).

Artigo III

- Analisar por meio de análises histopatológica o carcinoma tubular e sólido e descrever suas principais características relacionadas com seu arranjo celular, composição colágena e vascularização; avaliar ultraestruturalmente a interação célula-célula, célula-matriz e membrana basal; e por imunohistoquímica verificar a presença de proteínas relacionadas com a transição epitélio-mesenquimal, proliferação e morte celular, angiogênese e de matriz extracelular como colágeno e glicoproteína.

Artigo IV

-Realizar o cocultivo celular com células de carcinoma inflamatório mamário canino (IPC-366) associado a células-tronco de membrana amniótica canina (AMC) associada ou não a doxorrubicina (DOXO); verificar para cada um destes tratamentos a viabilidade, crescimento e ciclo celular; a dosagem de hormônios relacionados com a cadeia esteroidogênica; e a presença de receptores de estrógeno e progesterona assim como proteínas relacionadas com proliferação e angiogênese por meio de citometria de fluxo.

Artigo V

-Realizar o cocultivo celular com células de carcinoma sólido mamário canino (TCM) associado a células-tronco de membrana amniótica canina (AMC) associada ou não a doxorrubicina (DOXO); e verificar para cada um destes tratamentos a viabilidade, crescimento, ciclo e proliferação celular.

3. Artigo I - Câncer de Mama Humano e Canino: O estado da Arte da Terapia e Novas Abordagens

Jéssica Borghesi¹, Ana Carolina Rabelo¹, Lara Carolina Mario¹, Franceliusa Delys de Oliveira¹, Fausto Assunção Fernades¹, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação¹, Maria Angelica Miglino¹, Phelipe Oliveira Favaron¹, Ana Claudia Oliveira Carreira^{1,2}

¹Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo (FMVZ-USP), Sao Paulo, CEP, Brazil;

²NUCEL (Cell and Molecular Therapy Center), Internal Medicine Department, Medical School, University of São Paulo, São Paulo 05360-130 SP, Brazil.

RESUMO: O câncer de mama é o câncer feminino mais frequente, sendo a principal causa de morte. Da mesma forma, em cadelas o câncer de mama é a principal neoplasia, contudo sua taxa de incidência é três vezes maior do que em mulheres. O câncer de mama é um tumor altamente heterogêneo e esta característica é o que dificulta seu tratamento clínico e, conseqüentemente, sua cura. Esta heterogeneidade pode ser explicada por três fatores distintos, sendo estes: as mutações somáticas nos principais genes envolvidos no câncer de mama; as alterações epigenéticas e alterações no microambiente tumoral, desempenhando um papel crucial durante a iniciação, progressão e metástase tumoral. Devido à heterogeneidade clínica, morfológica e biológica que estes tumores apresentam, é necessário que se realize tanto a classificação histológica quanto molecular para melhor conhecimento do tumor e acessar a melhor abordagem terapêutica. Várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas desta neoplasia em cadelas são semelhante aos humanos, o que torna o cão um potente modelo de estudo comparativo para as mulheres. Devido ao grande número de trabalhos publicados diariamente sobre o câncer de mama e depositados no Pubmed, esta revisão tem como objetivo apresentar uma atualização sobre como ocorre a formação desse tumor e sua atual classificação em humanos e cães, com base nas mutações genéticas que inicializam esse processo e destacar as inovações que vem sendo pesquisadas para tratamentos alternativos tais como o papel da matriz extracelular na progressão do câncer e o uso de células-tronco.

Palavras-Chave: câncer de mama; célula-tronco; modelo animal; terapia alternativa

3.1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o câncer feminino mais frequente, afetando 2,1 milhões de mulheres a cada ano, sendo a principal causa de morte. Em 2018, estima-se que 627.000 mulheres morreram de câncer de mama, sendo que este valor corresponde a 15% de todas as mortes entre as mulheres (WHO, 2018). Da mesma forma, em cadelas o câncer de mama é a principal neoplasia, contudo sua taxa de incidência é três vezes maior do que em mulheres (MOE, 2001; MISDORP, 2002; DAVIDSON, 2003; DUTRA et al., 2004).

O câncer de mama é um tumor altamente heterogêneo e esta característica é o que dificulta seu tratamento clínico e, conseqüentemente, sua cura. Esta heterogeneidade pode ser explicada por três fatores distintos, sendo estes: as mutações somáticas nos principais genes envolvidos no câncer de mama (*p53*, *PTEN*, *BRAC1* e *BRAC2*) (MOORE-SMITH; BORIS PASCHE, 2011); as alterações epigenéticas que podem gerar o silenciamento tumoral de genes e/ou a ativação de oncogenes (DWORKIN et al., 2009); e alterações no microambiente tumoral sendo este o local onde o tumor está inserido, desempenhando um papel crucial durante a iniciação, progressão e metástase tumoral (DEMASI et al., 2013; WU; DAI, 2016; DEOCESANO-PEREIRA, et al., 2017).

Devido à heterogeneidade clínica, morfológica e biológica que estes tumores apresentam, é necessário que se realize tanto a classificação histológica quanto molecular para melhor conhecimento do tumor e acessar a melhor abordagem terapêutica (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009; GEYER et al., 2009; WEIGELT; REIS-FILHO, 2009). Embora o modelo de classificação histológica seja muito importante como prognóstico e já esteja muito bem estabelecido tanto na patologia humana (LI et al., 2005; STINGL; CALDAS, 2007) quanto animal (MISDORP et al., 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2001; CASSALI et al., 2014), a classificação molecular, até o momento, encontra-se bem definida apenas para o câncer de mama humano, onde podemos encontrar cinco subtipos moleculares sendo estes: luminal A; luminal B; superexpressão de HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2); basal e mama normal, e mais recentemente outro subtipo foi descoberto e denominado *claudin-low* (MINN, 2005; MONTGOMERY et al., 2012; AFRICANDER; STORBECK, 2018).

Dentre todos os tipos de câncer de mama, o mais raro e mais agressivo é o carcinoma inflamatório (PEÑA et al., 2003; GOMES et al., 2006; MUELLER et al., 2007). Esta agressividade está relacionada à sua forma patológica de como este tumor se manifesta, o que o torna inacessível à intervenção cirúrgica (VERMEULEN et al., 2010;

DAWOOD et al., 2011). O tratamento para este tipo tumoral em humanos é multimodal, envolvendo quimioterapia adjuvante, radioterapia e hormonioterapia (ROBERTSON et al., 2010; CHAKRABARTI et al., 2017) . Contudo, a maioria dos carcinomas inflamatórios são triplo negativos e não respondem à hormonioterapia (WALSHE et al., 2005; VAN DEN EYNDEN et al., 2006)

Várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas desta neoplasia em cadelas são semelhante aos humanos (GOMES et al., 2006), o que torna o cão um potente modelo de estudo comparativo para as mulheres (BENTUBO et al., 2006).Tendo em vista a importância desse tipo de câncer e seus impactos na Saúde Pública e no mercado veterinário, inúmeros trabalhos são conduzidos na tentativa de identificar novos tratamentos, melhorar os atuais ou mesmo caracterizar melhor os tumores para incrementar tais tratamentos.

Devido ao grande número de trabalhos publicados diariamente sobre o câncer de mama e depositados no Pubmed (377.433) esta revisão tem como objetivo apresentar uma atualização sobre como ocorre a formação desse tumor e sua atual classificação em humanos e cães, com base nas mutações genéticas que inicializam esse processo e destacar as inovações que vem sendo pesquisadas para tratamentos alternativos tais como o papel da matriz extracelular na progressão do câncer e o uso de células-tronco.

3.2. PROCESSO DE CARCINOGENESE

O desenvolvimento tumoral ocorre através de fases, isto é, da exposição da célula ao agente causador, agentes químicos, hormonais, epigenéticos, ambientais ou radioativos, conferindo assim propriedades-chaves às células cancerígenas incluindo proliferação, invasão, metástase e angiogênese, bem como sua capacidade de evitar a supressão do crescimento e apoptose das células tumorais. (IRMINGER-FINGER; JEFFORD, 2006; SOLTANIAN; MATIN, 2011; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O processo de carcinogênese ocorre em três estágios distintos: iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação é o processo no qual ocorrem mudanças celulares metabólicas em uma célula saudável devido à sua exposição a um carcinógeno, este é o passo inicial no desenvolvimento neoplásico (UNSCEAR, 1993; COX, 1994). Durante o processo de promoção, a célula a qual foi transformada e encontra-se inativa, sofre um estímulo que inicia o processo de proliferação celular, provocando um desequilíbrio celular (UPTON et al., 1986). Por fim, a progressão é o processo pelo qual, ocorrem sucessivas

mudanças na célula neoplásica dando origem a subpopulações cada vez mais malignas. Este processo pode ser acelerado por exposições repetidas a estímulos carcinogênicos, levando ao crescimento acelerado do tamanho do tumor, e podendo também as células sofrerem mutações adicionais, levando a uma heterogeneidade crescente da população de células. (UNSCEAR, 2000). A heterogeneidade celular dinâmica, uma característica do desenvolvimento maligno pode, em muitos casos, ser uma consequência da aquisição precoce de mutações específicas de genes que desestabilizam o genoma (HARTWELL; KASTAN, 1994).

Desta maneira, este desenvolvimento somente é possível através da formação de células-tronco tumorais (CSC), as quais são também conhecidas como células iniciadoras de tumores (CIT) (CROKER et al., 2008). As CSC podem ser derivadas tanto de células-tronco normais que possuem capacidade de autorrenovação como também por células progenitoras que adquirem essa capacidade de autorrenovação devido a mutações (SELL, 2004). Esta transformação de uma célula normal sendo ela uma célula-tronco ou progenitora em uma célula tumoral é um processo altamente complexo que envolve múltiplos fatores que são causados pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas (MUTSAERS; WALKLEY, 2014).

Após o surgimento das CSC em um organismo, elas vão se dividir assimetricamente criando dois tipos celulares, um tipo que mantém a autorrenovação e outro que possui capacidade de se diferenciar em células tumorais, porém sem a capacidade de manter e propagar o desenvolvimento do tumor (NAKAGAWARA; OHIRA, 2004). Contudo apesar dos tumores surgirem de uma única célula mutada, quase todos os tumores se tornam muito heterogêneos expressando marcadores distintos e conteúdo células proliferativas mais diferenciadas (ALMENDRO et al., 2013; DE SOUZA et al., 2013).

Desta mesma forma, é através das CSC que surgem os tumores mamários, sendo o câncer de mama mais comum e também o que causa maior mortalidade em mulheres ao redor do mundo, apresentando uma incidência três vezes maior em cadelas (RUTTEMAN et al., 2000; DUTRA et al., 2004; JEMAL et al., 2008). Contudo, a maior dificuldade nos estudos acerca de seu tratamento está relacionada com a etiologia variada que estes tumores possuem, sendo este influenciado tanto por fatores ambientais como genéticos e hormonais (ELLSWORTH et al., 2010). Esta diversidade também pode ser explicada pela desregulação de diversas vias que governam principalmente processos como morte, proliferação e diferenciação celular (KREEGER, LAUFFENBURGER, 2010).

3.3 MUTAÇÕES GÊNICAS NO CÂNCER DE MAMA

A carcinogênese mamária é um processo de várias etapas, iniciando-se com uma hiperplasia mamária, onde as células epiteliais mamárias se proliferam preenchendo a luz ductal ou lobular da glândula. Após esta proliferação, migração e invasão celular estas células se tornam localmente invasivas e metastáticas (SAHIN et al., 2016).

Uma das maiores dificuldades no tratamento clínico deste tipo de câncer, se deve ao fato deste ser altamente heterogêneo, podendo esta heterogeneidade ser explicada por três fatores distintos que são extremamente importantes em sua iniciação e progressão tumoral. São estes processos: mutações somáticas que podem gerar perda ou ganho de supressores tumorais ou oncoproteínas, respectivamente; alterações epigenéticas que causam alterações no padrão de expressão gênica; e alterações no microambiente tumoral que também podem gerar mudanças na expressão gênica (BASSE; AROCK, 2015; SEMENZA, 2015; WU; DAI, 2016).

As mutações gênicas mais comumente observadas em tumores mamários se encontram nos genes: *p53*, *PTEN*, *BRCA1* e *BRCA2* (MOORE-SMITH; PASCHE, 2011). O gene *p53* atua como um regulador na progressão do ciclo celular mediante a resposta a danos no DNA (LANGEROD et al., 2007). A mutação neste gene ocorre em aproximadamente de 20% a 30% dos casos primários de carcinoma mamário humano (SULLIVAN et al., 2002). Mutações similares ao humano no gene *p53* foram identificadas em tumores primários em pacientes caninos incluindo os tumores mamários (VAN LEEUWEN et al., 1996; CHU et al., 1998; MAYR et al., 1998). Estes incluem mutações pontuais nos códons 236, 245, 249, dentro do éxon 7 do gene *p53* (VAN LEEUWEN et al., 1996; MAYR et al., 1998). Tumores com mutação no gene *p53* são mais propensos a serem tumores altamente invasivos, pouco indiferenciados e com alto grau de malignidade (BOSARI et al., 1993), sendo considerado um marcador útil para avaliar a malignidade em tumores mamários humano e canino (ILHAN et al., 2008).

O gene *PTEN* é um supressor tumoral que inibe o crescimento celular durante a fase G1 do ciclo celular (BOSE et al., 2002). Mutações ou reduções em sua expressão estão associadas a uma ampla variedade de tumores (TAMGUNEY et al., 2007), incluindo o câncer de mama onde ocorre uma taxa de 10-40% de perda de heterozigiosidade na região do cromossomo 10q23 onde está contido o gene *PTEN* (MARSH et al., 1998; FREIHOFF et al., 1999). Esta redução ocorre em humanos em 83% dos casos de câncer de mama, estando também associada à progressão tumoral (BOSE et al., 1998; PERREN et al.,

1999). Contudo, em tumores caninos esta redução ocorre em torno de 30 a 35% dos casos (QIU et al., 2008; RESSEL et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que esta redução também está correlacionada com a perda do receptor de estrógeno (ER), portanto a avaliação do gene *PTEN* representa um importante fator de prognóstico (ZHANG et al., 2013). Tong et al. (2016) sugere que o gene *PTEN* está associado ao desenvolvimento de tumores e, conseqüentemente, ao crescimento da oncologia veterinária.

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* aparentemente funcionam na reparação do DNA, transcrição gênica e manutenção do genoma (LEE; BOYER, 2001). As mutações nesses genes resultam na expressão de uma proteína não funcional com perda do controle do ciclo celular e nos mecanismos de reparo do DNA (WELCSHI; KING 2001). Mutações nesses dois genes foram associadas a 20% dos casos de câncer de mama humano familiar diagnosticados. Em cães existem poucos estudos sobre as mutações nestes genes, porém até o momento alguns estudos em tumores mamários caninos demonstraram que mutações nos genes, *BRCA 1* e *BRCA 2* podem afetar suas funções contribuindo desta maneira para o risco de câncer de mama canino (YOSHIKAWA et al., 2008; RIVERA et al., 2009; YOSHIKAWA et al., 2012; OCHIAI et al., 2015).

Todavia, atualmente sabe-se que os mecanismos que governam a ocorrência do câncer, não são conseqüências somente de mutações genéticas, mas também de modificações epigenéticas (BASSE; AROCK, 2015). As alterações epigenéticas podem gerar o silenciamento tumoral de genes e/ou a ativação de oncogenes (DWORKIN et al., 2009), porém são alterações que ocorrem somente nos genes, sem que ocorra uma mudança na sequência do DNA (CHUANG; JONES, 2007). Essas alterações, podem incluir a metilação de dinucleotídeos CpG em regiões promotoras e mudanças na cromatina e nas histonas, sendo esses eventos responsáveis pelo fatores de transcrição do DNA (LO; SUKUMAR, 2008) e também interferência do RNA, o qual modifica a expressão dos genes em nível pós-transcricional através da ação de RNAs não codificadores de proteínas como os microRNAs (HUANG; NAYAK, 2011).

No câncer encontra-se tanto uma hipermetilação nas CGIs, como uma hipometilação a nível global. Sendo a hipometilação do DNA a primeira alteração epigenética observada nas células cancerígenas, onde ocorre uma instabilidade genômica predispondo o indivíduo a mutações, deleções, amplificações, inversões e translocações, podendo também ter como conseqüência a reativação de genes que deveriam estar normalmente silenciados, levando desta forma a ativação de vias que promovem o crescimento celular e os mecanismos anti-apoptóticos (EHRlich, 2002; FEINBERG;

TYCKO, 2004). Já a hipermetilação na região promotora de genes específicos também pode ser considerado um evento precoce na tumorigênese e está relacionado ao silenciamento de genes supressores tumorais, criando um ambiente propício ao acúmulo de alterações tanto genéticas como epigenéticas (ESTELLER, 2007; ISSA, 2008). Pesquisas voltadas para o entendimento dos mecanismos epigenéticos envolvidos durante a carcinogênese estão cada vez mais sendo realizadas, uma vez que estes mecanismos podem ser utilizados como marcadores moleculares no câncer. Além disso podem ajudar em novas abordagens terapêuticas uma vez que ao contrário das mutações gênicas as alterações epigenéticas são reversíveis (ESTELLER et al., 20001; BEHERA, 2017).

E por fim, outro fator que pode gerar mudanças na expressão gênica são as alterações no microambiente tumoral, sendo este o local onde o tumor está inserido, desempenhando um papel crucial durante a iniciação, progressão e metástase tumoral (WU; DAI, 2016). O microambiente tumoral pode ser subdividido em: microambiente químico que engloba condições como pH, PO_2 e metabólitos; e microambiente celular que inclui as células tumorais, as células estromais e a matriz extracelular (MEC) produzidas por essas células (SEMENZA, 2015). Desta forma, a MEC vai ser de grande importância para progressão do câncer de mama, sendo esta composta por vários tipos celulares, fatores de crescimento, citocinas e glicoconjugados (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016).

Atenção considerável tem sido dada às mutações somáticas e às alterações epigenéticas, que são facilmente questionadas por técnicas moleculares de alto rendimento. Em contraste, as alterações no microambiente do tumor são menos facilmente testadas, mas têm efeitos profundos na progressão do câncer (Figura 1).

Figura 1: Desenho esquemático do processo de mutação e progressão tumoral.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Os processos de mutações genéticas, modificações epigenéticas e alterações no microambiente tumoral, assim como células-tronco que sofrem divisões assimétricas podem contribuir para o processo de iniciação, promoção e progressão das células tumorais. Estas por sua vez ainda são capazes de sofrer metástase.

3.4.O PAPEL DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

A matriz extracelular (MEC) dos tumores sofre uma continua remodelação a qual provoca sinais bioquímicos e biofísicos os quais influenciam a adesão e migração celular (GEIGER; YAMADA, 2011). Desta forma, a MEC se caracteriza como um importante fator de análise, visto que para que as células tumorais possam sair de seu sítio de origem e chegar em outros pontos do corpo é necessário que as moléculas de adesão sejam degradadas (FRIEDL et al., 2012; STIVAROU; PATSAVOUDI, 2015). A metástase de uma célula requer vários sinais de produtos químicos (citocinas, quimiocinas, hormônios, neurotransmissores) para que inicie esta migração celular. Para isso moléculas de adesão celular, as quais estão localizadas nas membranas celulares, desempenham um papel importante nesta fase da cascata metastática (HUMPHRIES; NEWHAM, 1998).

Existem quatro classes principais de moléculas de adesão, sendo estas: caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas. Porém, quem desempenha papel importante na

invasão e metástase dos tumores são as caderinas (PAREDES et al., 2012), E-caderina (caderina epitelial), N-caderina (caderina neuronal) e P-caderina (caderina placentária). Estas, por sua vez, ligam-se a um grupo de proteínas interligadas, denominadas cateninas (α , β e γ) (HUMPHRIES; NEWHAM, 1998). Quaisquer perturbações funcionais no complexo caderina-catenina (disfunção e/ou falta de caderina ou catenina) pode reduzir a adesão celular. Isso leva a um aumento na taxa de invasão potencial do tumor e pode apoiar a metástase (ASGEIRSSON et al., 2000).

Outro processo que desempenha um papel significativo na progressão do tumor e da metástase é o processo de transição epitélio-mesenquimal (MET) (DE CRAENE; BERX, 2013; PUISIEUX et al., 2014). Este é caracterizado pela perda das características epiteliais e ganho de propriedades mesenquimais. Sendo assim, caracterizado pela perda de E-caderina e citoqueratina juntamente com o ganho de N-caderina, fibronectina e vimentina (proteína associada a células mesenquimais) (WU et al., 2016).

Além das moléculas de adesão, a MEC é uma malha composta por moléculas proteicas que auxiliam em sua estrutura. Contém colágenos, fibronectina, elastina, laminina, bem como proteínas especializadas que atuam na regulação da matriz, como fatores de crescimento e glicoproteínas unido à integrinas e diversos polissacarídeos que estruturam o tecido celular e regulam diversos componentes dentro de uma célula (DALEY; PETERS; LARSEN, 2007; BAIOCCHINI et al., 2016). Dentre estes componentes, o mais significativo é o colágeno, o qual determina propriedades funcionais primárias da matriz. E mudanças na deposição ou degradação de colágeno pode levar a perda da homeostase da MEC, e mesmo que pequenas mudanças na homeostase do microambiente podem ter efeitos na proliferação de células tumorais (PROVENZANO et al., 2006).

A proliferação das células tumorais faz com que a MEC sofra mudanças arquitetônicas significativas em uma interação dinâmica entre estas células e seu microambiente. Dentre as diversas alterações que a MEC sofre, as alterações relacionadas ao aumento de secreção de fibronectina e de colágeno I, III e IV demonstram a progressão tumoral (MALIK et al., 2015). Sendo assim, o colágeno é importante para conferir resistência e proteção a membrana, e a quantidade de colágeno formada e degradada é processo que a célula, de maneira geral, controla para manter a arquitetura da fibra e do tecido (REISENAUER et al., 2007). A degradação do colágeno ocorre através das metaloproteinases de matriz (MMPs) que também expõem os componentes de sinalização incorporadas a MEC (DERYUGINA; QUIGLEY, 2006) (Figura 2).

Figura 2: Desenho esquemático da matriz extracelular na glândula mamária normal e no câncer de mama.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Em [A] glândula mamária normal, demonstrando como ocorre a organização de sua matriz extracelular (MEC). Pode ser observado que a interação catenina-caderina, e a presença de colágenos e fibronectina encontram-se normais. Em [B] demonstrando como ocorre a desorganização dos componentes da MEC no câncer de mama. Vale ressaltar que há um aumento de fibronectina e colágenos que promovem o enrijecimento da MEC, facilitando o processo de metástase. Observa-se também que as células epiteliais passam a apresentar fenótipo de células mesenquimais.

As MMPs se encontram na forma inativa, contudo quando incorporadas aos colágenos fazem com que vários fatores de crescimento sejam ativados após a degradação da MEC e consigam se ligar ao seu receptor. Quando ocorre a degradação da MEC pela MMP-2, esta libera o fator de crescimento transformante β (TGF- β). Após sua liberação, o TGF- β tem a capacidade de modular a invasão celular, a resposta imune e a capacidade de proliferação celular (CHIU et al., 2002; KESSENBRÖCK, et al., 2015). Além do mais, o TGF- β induz à MET que pode ser facilitado através da expressão aumentada da proteína PARP3 (*PolyADP-Ribose Polymerase 3*), que promove a motilidade celular e quimiorresistência nas células epiteliais de mama (LABELLE et al., 2011; KARICHEVA et al., 2016). Desta forma, as MMPs não apenas auxiliam na degradação da barreira da MEC, mas também liberam fatores ativos de crescimento que promove a angiogênese tumoral (DISCHER et al., 2009). Assim, já foi demonstrado que as MMP-2 e MMP-9 tanto em tumores mamários de humano quanto canino desempenham um papel importante na carcinogênese, estando sua expressão aumentada relacionada com fatores de prognóstico desfavoráveis (LOUKOPOULOS et al., 2003; LI et al., 2004; LI et al., 2017).

3.5. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS

O câncer de mama é considerado uma doença complexa por apresentar alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Desta forma, tumores mamários com histologia e clínica semelhante podem apresentar diferentes prognósticos e respostas terapêuticas (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009; GEYER et al., 2009; WEIGELT, REIS-FILHO; 2009). Devido a isso, primeiramente a classificação histológica se faz necessária para que ocorra uma padronização perante os diversos tipos histológicos existentes. Em mulheres podemos classificar os tumores mamários em carcinoma in situ podendo este ser sub classificado em ductal ou lobular; e em carcinoma invasivo sendo este por sua vez subdividido em diversos outros tipos. Nesta classificação os principais são o carcinoma ductal invasivo, lobular invasivo, tubular, medular, papilar e mucinoso (LI et al., 2005; STINGL; CALDAS, 2007; LANKHAI et al., 2012), ver classificação completa Quadro 1. Esta classificação histológica também é muito semelhante em cadelas, assim podemos classificar de uma forma geral os tumores mamários caninos em: carcinomas, tipos especiais de carcinomas, sarcomas e outros sarcomas. Da mesma forma que os tumores mamários humanos, os caninos também apresentam subdivisões dentre estas

classificações (MISDORP et al., 1999; GOLDSCHMIDT et al., 2011, CASSALI et al., 2011), ver classificação completa Quadro 1.

Quadro 1: Classificação dos tumores mamários malignos humano e canino.

HUMANO	CANINO
<p>Carcinoma microinvasivo</p> <p>Carcinoma mamário invasivo</p> <p>Carcinoma ductal invasivo, SOE</p> <p>Carcinoma tipo misto</p> <p>Carcinoma pleomórfico</p> <p>Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto</p> <p>Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos</p> <p>Carcinoma com elementos melanóticos</p> <p>Carcinoma lobular invasivo</p> <p>Carcinoma lobular clássico</p> <p>Carcinoma lobular sólido</p> <p>Carcinoma lobular alveolar</p> <p>Carcinoma lobular pleomórfico</p> <p>Carcinoma tubulo-lobular</p> <p>Carcinoma lobular misto</p> <p>Carcinoma tubular</p> <p>Carcinoma cribriforme invasivo</p> <p>Carcinoma com elementos medulares</p> <p>Carcinoma medular</p> <p>Carcinoma medular atípico</p> <p>Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares</p> <p>Carcinoma mucinoso</p> <p>Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete</p> <p>Carcinoma micropapilar invasivo</p> <p>Carcinoma com diferenciação apócrina</p> <p>Carcinoma metaplásico sem tipo especial</p> <p>Carcinoma adenoescamoso de baixo grau</p> <p>Carcinoma metaplásico fibromatose-simile</p> <p>Carcinoma de células escamosas</p> <p>Carcinoma de células fusiformes</p> <p>Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal</p> <p>Diferenciação condroide</p> <p>Diferenciação óssea</p>	<p>Carcinomas</p> <p>Carcinomas <i>in situ</i></p> <p>Carcinoma ductal <i>in situ</i></p> <p>Carcinoma lobular <i>in situ</i></p> <p>Carcinoma em um tumor misto</p> <p>Carcinoma papilar</p> <p>Carcinoma tubular</p> <p>Carcinoma sólido</p> <p>Carcinoma de tipo especial</p> <p>Carcinoma Micropapilar</p> <p>Carcinoma lobular invasivo</p> <p>Carcinoma lobular pleomórfico</p> <p>Carcinoma secretor</p> <p>Carcinoma mucinoso</p> <p>Carcinoma rico em lipídeos</p> <p>Carcinoma de células escamosas</p> <p>Carcinoma de células fusiformes</p> <p>Carcinoma anaplásico</p> <p>Neoplasias mamárias com diferenciação sebácea</p> <p>Neoplasias Mioepiteliais</p> <p>Adenomioepitelioma maligno</p> <p>Sarcomas</p> <p>Fibrossarcoma</p> <p>Osteossarcoma</p> <p>Carcinossarcoma</p> <p>Sarcoma em tumor misto</p> <p>Outros sarcomas</p> <p>Condrosarcoma</p> <p>Lipossarcoma</p> <p>Hemangiossarcoma</p>

Diferenciação em outros tipos mesenquimais Carcinoma metaplásico misto Carcinoma mioepitelial Tipos raros Carcinoma com elementos neuroendócrinos Tumor neuroendócrino bem diferenciado Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado (carcinoma de pequenas células) Carcinoma com diferenciação neuroendócrina Carcinoma secretor Carcinoma papilar invasivo Carcinoma de células acinares Carcinoma mucoepidermoide Carcinoma oncocítico Carcinoma rico em lípidos Carcinoma de células claras rico em glicogênio Carcinoma sebáceo Tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos Cilindroma Hidroadenoma de células claras	
---	--

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Classificação dos carcinomas de mama invasivo humano baseado em Lankhai et al. (2012), e dos tumores malignos canino baseado em Cassali et al. (2011).

Embora este modelo de classificação histológica seja importante como prognóstico há necessidade de verificação dos componentes moleculares presentes para prever uma resposta terapêutica mais direcionada. Desta maneira, a identificação dos subtipos moleculares do câncer de mama humano veio para corrigir este problema. Assim, cinco subtipos moleculares inicialmente foram descritos, sendo estes: luminal A; luminal B; superexpressão de HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2); basal e mama normal, e mais recentemente outro subtipo foi descoberto e denominado *claudin-low* (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2003; HERSCHKOWITZ et al., 2007; PRAT et al., 2010).

O subtipo luminal A apresenta melhor prognóstico em relação aos demais sendo encontrado em 60% dos casos. Os tumores deste grupo são positivos para os receptores de estrogênio (RE) e/ou progesterona (RP) e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (SOTIRIOU et al., 2003; SØRLIE et al., 2003). Ainda é caracterizado pela elevada expressão de genes de células epiteliais luminas como as citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Esse subtipo deve apresentar um índice mitótico de Ki67 inferior a 14% (CHEANG et

al., 2009; KENNECKE et al., 2010; VODUC et al., 2010). O fenótipo deste tipo tumoral está associado à assinatura de melhor prognóstico e responde à terapêutica com antiestrogênicos. Já o subtipo luminal B, também apresenta receptores hormonais positivos, contudo podem ser expressos em baixos níveis. Além disso, são também caracterizados por apresentarem expressão de genes associados ao HER2 e expressarem baixa ou moderada quantidade de alguns genes como, por exemplo, os genes das citoqueratinas 7, 8, 18 e 19. Seu maior índice de proliferação celular está relacionado a um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (SØRLIE et al., 2003; LACROIX et al., 2004).

O subtipo superexpressão HER2, como o próprio nome já diz apresenta uma elevada expressão nas moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico o HER2, porém negatividade para receptores hormonais, apresentando o segundo pior prognóstico em relação aos demais (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004). Esses tumores apresentam melhores respostas a fármacos que bloqueiam a atividade do HER2, assim como o trastuzumab (NIELSEN et al., 2004; BERTUCCI et al., 2006).

O subtipo basal, ou triplo negativo como também é conhecido, apresenta fenótipo negativo para RE, RP e HER2, sendo caracterizado pela expressão de vários genes nas células progenitoras basais/mioepiteliais mostrando positividade para CK5, CK6, CK14, CK17, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina e p63 (PAREDES et al., 2007; KENNECKE et al., 2010; VODUC et al., 2010). Esse perfil está ligado a mutações genéticas no gene BRCA1 o qual apresenta baixa expressão causado por metilação de seu gene promotor ou por inativação de transcrição (TURNER et al., 2007).

O subtipo mama normal “breast-like” demonstra elevação na expressão de genes comuns as células epiteliais normais da mama, tecido adiposo e outros tipos de células não epiteliais (PEROU et al., 2000). Estes tumores apresentam genes comuns entre subtipo basal e luminal (SØRLIE, 2004). E por fim o último subtipo molecular a ser descoberto, o claudin-low é caracterizado por baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares assim como as claudinas 3, 4 e 7, ocludinas e a E-caderina (HERSCHKOWITZ et al., 2007). Contudo, apresenta um aumento na expressão de marcadores de transição epitélio mesenquimal, marcadores endoteliais e linfocíticos e de células-tronco tumorais com fenótipo CD44+/CD24- (PRAT et al., 2010; LOBBA et al., 2012; LOBBA et al., 2018).

Embora estes cinco subtipos moleculares estejam muito bem estabelecidos no câncer de mama humano, na espécie canina pouco se sabe a respeito. Devido a isso,

diversos autores vem estudando através de análises de imunohistoquímica se estes mesmos subtipos moleculares estão presentes em cães, e o que foi verificado é que os quatro principais subtipos como luminal A, luminal B, superexpressão HER2 e basal se encontram presentes em tumores mamários caninos (GAMA et al., 2008; SASSI et al., 2010). Porém, apesar desses estudos mostrarem que pode haver a presença desses subtipos moleculares entre o cão e o homem, ainda não foi confirmado que as assinaturas moleculares são semelhantes entre eles (MORRIS, 2016).

A utilidade dessa nova classificação molecular para prever desfechos levantou esperanças de sua adaptação na prática clínica. No entanto, o uso rotineiro de análise de microarray ou sequenciamento do genoma ainda apresenta elevado custo. Devido a isso, na medicina humana foram desenvolvidos três principais testes comerciais de perfil de multi-genes para avaliar amostras de pacientes individuais com câncer de mama, fornecendo desta maneira um diagnóstico mais confiável e menos subjetivo que a análise de imunohistoquímica (TOSS; CRISTOFA, 2015). Alguns testes como por exemplo, o MammaPrint prevê apenas se o risco do tumor é baixo ou alto. Já a análise de predição de microarray como PAM50 (50 genes) e o Blueprint (80 genes), determina os 4 principais subtipos moleculares (luminal A, luminal B, superexpressão HER2 e basal) (PARKER et al., 2009; MORRIS, 2016).

Contudo, devido aos poucos números de casos estudados em relação a genômica e proteômica de câncer de mama canino, a utilização destes testes não é utilizado na medicina veterinária para diagnóstico e prognóstico, isto pode ser justificado uma vez que os cães não se beneficiam de terapias anti-estrógeno e anti-HER2, o que significa que a subtipagem molecular pode ter menos valor terapêutico nesta espécie (MORRIS, 2016). Contudo acreditamos que se o perfil molecular de tumores mamários caninos fosse melhor investigado e teste validados para espécie fossem comercializados estas terapias dirigidas poderiam ser utilizadas na clínica veterinária com melhor resposta do que as terapias atuais.

3.6. INCIDÊNCIA NO CÂNCER DE MAMA

Dentre os tipos histológicos do câncer de mama humano, o carcinoma ductal in situ (DCIS) é a forma mais comum (90%) de câncer de mama não invasivo (SHARMA et al., 2010). Já entre os invasivos, o carcinoma ductal invasivo (IDC) é o tipo mais comum

correspondendo de 70% a 85% (LIU et al., 2010). Ainda em relação aos carcinomas invasivos o carcinoma tubular de mama, é um subtipo incomum entre o câncer de mama nas mulheres sendo responsável por apenas 1 a 5% dos casos (CABRAL et al., 2005; SULLIVAN et al., 2005; RAKHA et al., 2010). Geralmente este tipo está associado a um excelente prognóstico, com baixa taxa de metástase e de recidiva local com uma alta taxa de sobrevida local de 97% aos 10 anos (DIAB et al., 1999; LIVI et al., 2005; FEDKO et al., 2010).

Em contrapartida o carcinoma tubular são os mais comumente encontrados em cadelas (GOLDCHIDT et al., 2011; CASSALI et al., 2011), apresentando também um bom prognóstico quando comparada com outros tipos, como é o caso do carcinoma sólido. O carcinoma sólido também é frequentemente encontrado em tumores mamários canino (este tipo não se apresenta em mulheres), porém, ao contrario do tipo tubular, este é provavelmente o mais avançado do que os outros tipos, como é frequentemente observado quando os tumores se desenvolvem durante longo período de tempo sem intervenção cirúrgica (CASSALI et al., 2011).

Porém dentre todos os subtipos histológicos, tanto em humanos como em cães, o tipo mais raro, porém mais agressivo é o carcinoma inflamatório (PEÑA et al., 2003; GOMES et al., 2006; MUELLER et al., 2007). O carcinoma inflamatório é indiscutivelmente a forma mais agressiva e mortal do câncer de mama (WALSHE; SWAIN, 2005). Apresentando aproximadamente de 1 a 6% de todos os casos de câncer de mama humano nos EUA, e até 20% em todo o mundo (HANCE et al., 2005; ANDERSON et al., 2005; CHIA et al., 2008; VAN UDEN et al., 2015; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2015). E em cães apresentam incidência de 7,6% dos demais tipos tumorais mamários (PEREZ-ALENZA et al., 2001).

Esta agressividade, está relacionada à forma patológica distinta que este carcinoma apresenta. Ao contrario dos demais, ele não apresenta uma massa tumoral palpável, difundindo-se pelo estroma, desta maneira invadem facilmente os vasos linfáticos (KLEER et al., 2000; PEREZ-ALENZA et al., 2001; ROBERTSON et al., 2010). Acredita-se que um dos fatores determinantes para o rápido processo metastático da doença seja esta forma de invasão (VAN DER AUWERA et al., 2004; VERMEULEN et al., 2010). Devido a isso, o carcinoma inflamatório é considerado um tumor inoperável, o que torna o tempo de sobrevida livre da doença em mulheres para um período de 5 anos é possível somente em 34% (MAGNE et al., 2005; DAWOOD et al., 2011). Já em cadelas este tempo médio de

sobrevida global é ainda menor indo de 30 a 60 dias apenas (PÉREZ-ALENZA et al., 2001; MARCONATO et al., 2009).

A maioria dos casos de carcinoma inflamatório são do tipo molecular basal (triplo negativo) ou HER2 positivo (WALSHE et al., 2005; VAN DEN EYNDEN et al., 2006). Até o momento o carcinoma de mama inflamatório triplo negativo continua sendo um grande desafio tanto para medicina humana quanto veterinária em termos de diagnóstico e tratamento .

3.7. FATORES HORMONAIS NO CÂNCER DE MAMA

No câncer de mama tanto em humano quanto em cães, o agente hormonal é de extrema relevância, uma vez que todos seus subtipos moleculares estão associados à desregulação na produção dos esteroides. Em mulheres, pesquisas mostram que fatores como menarca precoce, menopausa tardia, primeira gestação tardia, obesidade, utilização de contraceptivos orais e reposição hormonal, aumentam as chances de se desenvolver câncer de mama (HENDERSON; FEILGESON, 2000). Já em cadelas, a incidência de câncer de mama aumenta conforme a expectativa de vida do animal aumenta, e diminui com a realização de ovariectomia em cadelas jovens (RUTTEMAN et al., 2001).

No desenvolvimento normal da glândula mamária, estrógenos e progestágenos atuam de maneira fisiológica. E como mencionado acima, a glândula mamária, quando exposta por muito tempo ao longo da vida a esses hormônios ou quando há desequilíbrio da homeostase, apresenta alta predisposição ao desenvolvimento de câncer (CARDIFF; KENNEY, 2007; HERVIR et al., 2011; AFRICANDER, STORBECK, 2018).

Destes hormônios, principalmente o estrógeno está associado com a carcinogênese por estimular a proliferação celular e expressão gênica, levando ao aumento nos erros de replicação do DNA, ou por causar danos diretos ao DNA através de produtos de oxidação (HERVIR et al, 2011; VAN DUURSEN et al., 2013). Tanto tecido mamário sadio, como tumores benignos ou malignos, apresentam receptores de estrógeno e progesterona (HILTON et al., 2015; AFRICANDER; STORBECK, 2018). No entanto, observa-se que em tumores em estágios mais avançados, e que apresentam grau maior de invasão, a expressão de ambos os receptores pode estar muito mais diminuída já que as células, a cada subtipo, vão se tornando menos dependentes de hormônios até chegarem ao nível do tumor triplo negativo, no qual a expressão desses receptores é bastante reduzida (RUTTEMAN, 2001).

Devido a essa regulação hormonal no desenvolvimento dos tumores de mama humano, os tratamentos mais convencionais atualmente em uso envolvem reguladores da produção hormonal, tais como Tamoxifeno e Letrozol, esses medicamentos não são utilizados na espécie canina abordaremos mais a respeito no tópico seguinte. O tamoxifeno é uma substância que compete pelo sítio de ligação do receptor de estrógeno, impedindo os efeitos destes hormônios no tumor, enquanto o letrozol é inibidor da enzima P450 aromatase, a qual converte andrógenos em estrógenos (VAN DUURSEN et al., 2013; HUANG et al., 2017). Sobre a endocrinologia do câncer de mama sabe-se que a produção de hormônios pelo tumor ocorre por duas vias preferenciais: via da sulfatase e da aromatase. Essa é uma importante informação tendo em vista que a maior parte dos tratamentos para tumores que são responsivos aos hormônios se baseiam em inibidores da via da aromatase e não em componentes da via da sulfatase (AKA et al., 2009).

A via esteroidogênica ocorre em órgãos endócrinos específicos, como a adrenal e os ovários, e se inicia com a conversão de uma molécula de colesterol em pregnenolona pela ação da enzima P450scc. A pregnenolona pode entrar em vias diferentes de formação dos progestágenos: na via $\Delta 4$ ela é convertida diretamente em progesterona pela ação da enzima 3β -HSD enquanto na via $\Delta 5$ é catalisada em 17α -hidroxipregnenolona pela enzima P450c17. A P450c17 é a enzima responsável pela conversão da progesterona em 17α -hidroxiprogesterona, além de converter esses progestágenos em andrógenos. A 17α -hidroxipregnenolona e progesterona são convertidas, respectivamente, em dehidroepiandrosterona e androstenediona por meio da enzima 17β -HSD. Essa enzima ainda é responsável pela formação do androstenediol e testosterona a partir da dehidroepiandrosterona e androstenediona, respectivamente. Uma vez que os andrógenos estão formados eles podem ser convertidos em estrógenos pela aromatização de sua cadeia por ação da enzima P450aromatase. Neste caso, a androstenediona e testosterona são convertidas em estrona e 17β -estradiol, respectivamente. Devido sua grande importância na produção de andrógenos, que são substrato para a formação de estrógenos, uma grande quantidade de 17β -HSD está associada com a formação de carcinomas mamários e podem ser alvo de terapias contra esses tumores (AKA et al., 2009).

Essa é a via de formação dos estrógenos a partir da aromatase, no entanto, sabe-se que uma alternativa é a produção desses hormônios pela via da sulfatase. Neste caso, ocorre uma conversão da estrona sulfatada e estradiol sulfatado em estrona e estradiol pela ação da enzima esteroide sulfatase. Esses hormônios sulfatados circulam normalmente no sangue periférico podendo alcançar órgãos-alvo e serem então convertidos às formas mais

ativas de esteroides. Por isso, essa é outra via que vem recebendo atenção, principalmente em casos de tumores com atividade endócrina, mas que não respondem a tratamentos com inibidores de aromatase (AKA et al., 2009; AFRICANDER, STORBECK, 2018).

É sabido também que em tumores mamários ER+, há perda de expressão de PR, podendo considerá-lo de pior prognóstico (DUNNWALD et al., 2007; PRAT et al., 2013; CHAN et al., 2015). E, portanto, pacientes que expressam altos níveis de PR, tem a possibilidade de ter um retorno positivo na terapia hormonal (MCGUIRE et al., 1977). Acredita-se que, além do efeito dos hormônios há também a interferência gênica, onde pode haver mutações em diferentes etapas do ciclo celular que resulta no desencadeamento do crescimento tumoral (HANAHAHAN, et al., 2000). Há diversos fatores gênicos, mas um exemplo bastante estudado é o *p53*, um gene bastante alterado nos casos neoplásicos (MOURA-GALLO et al., 2004).

Os níveis de ER e PR têm sido, utilizados nas avaliações clínicas, sendo considerados indicadores de prognóstico para prever o curso da doença nos pacientes e sua resposta a terapia hormonal adjuvante. No geral, tumores positivos para ER e PR têm melhor prognóstico de sobrevida do paciente além de responderem a terapia endócrina em comparação com aqueles cujos tumores são negativos para ambos receptores (CLARK et al., 1983; HORWITZ, 1988; DONEGAN, 1992).

3.8. TRATAMENTO

Os principais tipos de tratamento para o câncer de mama são: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia dirigida e hormonioterapia (DHANKHAR et al., 2010). O tratamento cirúrgico continua sendo o tratamento de escolha tanto em humanos (MATSEN; NEUMAYER, 2013) como em cães (SORENMO et al., 2013; HENRY, 2014), com exceção apenas do diagnóstico de carcinoma inflamatório. Já radioterapia é usada no câncer de mama precoce após a cirurgia de conservação da mama e em pacientes com câncer de mama localmente avançados pós-mastectomia (OVERGAARD et al., 1997), porém pouco utilizada na veterinária (DE MATOS et al., 2006; RANGEL et al., 2008).

Também após a cirurgia é utilizado a quimioterapia adjuvante com a finalidade de aumentar as taxas de sobrevida diminuindo os riscos de metástases. Nos cães, entretanto, a quimioterapia pós-operatória não é rotineiramente utilizada (HENRY, 2014). Em cães, com câncer de mama, a quimioterapia tem sido utilizada em casos de metástase e tumores inoperáveis que podem levar a morte ou eutanásia dos animais (SLEECKX et al., 2011).

Os quimioterápicos são agentes antineoplásicos os quais agem sistemicamente em nível celular mais especificamente em células que estão em processo de divisão (SCHAFER, 1996; BONASSA, 2005). Por muitos anos, o padrão ouro na quimioterapia adjuvante de câncer de mama humano, foi a associação de ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF) (STUART-HARRIS et al., 2005). Contudo os protocolos utilizando as antraciclina (epirrubina e doxorubicina) se mostraram ser mais eficazes que os utilizando CMF. E nos últimos anos os taxanos (paclitaxel e docetaxel) foram introduzidos (CAVALHEIRO et al., 2001; EBCTCG, 2005).

Desta maneira, os dois principais fármacos utilizados hoje nos tratamentos são as antraciclina e os taxanos. Tanto as antraciclina quanto os taxanos podem ser utilizados de forma individual, contudo quanto associados resultam em um potente protocolo de tratamento, pois o uso dessas duas drogas combinadas é capaz de promover um aumento na sobrevida de 3 a 5% dos pacientes, além de proporcionar redução na ocorrência de recidivas (SOUCHEK et al., 2017; RUBOVSKY; HORVATH, 2017). Entretanto, os taxanos como o paclitaxel apesar de serem muito utilizados em humanos, em cães não se obtiveram resultados satisfatórios devido a alta incidência de efeitos colaterais, devido a isso ela não é utilizado na medicina veterinária (MORRIS et al., 1993; POIRIER et al., 2004). Com isso, para cães, as drogas quimioterápicas de escolha são a doxorubicina, a ciclofosfamida e o 5-fluorouracil (SORENMO, 2003).

Outro tipo de tratamento que vem sendo utilizada nos últimos anos é a terapia direcionada, na qual utilizam-se substâncias ou drogas que bloqueiam o crescimento do câncer interferindo na função de moléculas específicas responsáveis pela sobrevivência de células tumorais (ELSTER et al., 2015; MARMÉ; SCHNEEWEISS, 2015; MITTENDORF et al., 2016). Para este tipo de terapia são utilizados os anticorpos monoclonais (mAbs), estes são imunoproteínas capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos, assim eles promovem uma resposta imunológica. Desta maneira os mAbs preservam as células normais e provocam efeitos menos tóxicos que quimioterapia (DEL DEBBIO et al., 2007).

Ainda nesse mérito, nos últimos anos com o desenvolvimento da terapia direcionada o anti-HER2 tornou-se um dos mais importantes alvos terapêuticos no câncer de mama. Assim, o prognóstico do câncer de mama HER2-positivo melhorou significativamente, devido a quatro agentes anti-HER2 licenciados utilizados na medicina humana, sendo eles: o inibidor lapatinibe, e os anticorpos monoclonais (mAbs) trastuzumabe, pertuzumabe e tucuzumabe entansina (HADDAD, 2010; MOYA-HORNO;

CORTÉS, 2015; MOASSER et al., 2015; SWAIN et al., 2015; MAXIMIANO et al., 2016).

Outro mAb, aprovado em estudos contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), é o bevacizumabe. O bevacizumabe age contra o VEGF, interferindo assim no processo de angiogênese tumoral, impedindo que este ligante interaja com seu receptor (COBLEIGH et al., 2003). No câncer de mama metastático, associações de bevacizumabe com protocolos convencionais de quimioterapia oferecem tratamentos novos e mais eficazes, sem aumentar significativamente a toxicidade (SHAUGHNESSY et al., 2001; MILLER et al., 2007; KAWALEC et al., 2015).

Contudo a utilização de mAbs na clínica veterinária acontece ainda apenas em estudos pré-clínicos *in vitro*, como podemos observar no estudo de Singer et al. (2012) onde foram identificados HER2 em linhagens de célula de carcinoma mamário canino, e foram reconhecidos por mAbs trastuzumabe, levando a inibição do crescimento das células tumorais. O mesmo grupo anos depois também demonstrou, que o anti-EGFR canino induziu inibição significativa de células tumorais em linhagens de células de câncer de mama canino (SINGER et al., 2014).

O tratamento de hormonioterapia é a prática em que consiste em utilizar antagonistas que sejam semelhantes ou supressores de hormônios, evitando que o estrogênio se ligue desta maneira em seus receptores, impedindo que ajam como fatores de crescimento das células tumorais (BRITO et al., 2014). Entretanto a indicação para este tratamento é realizada apenas, após a avaliação do paciente, o qual deve apresentar positividade para os receptores de estrógeno, com isso pacientes que apresentam câncer de mama triplo negativo são poderão utilizar este método de tratamento (BARRON et al., 2013). Como já mencionado anteriormente, as principais drogas utilizadas na terapia hormonal é o tamoxifeno e os inibidores da aromatase como o letrozol (CARVALHO et al., 2015).

Embora, o câncer de mama canino apresente similaridade em relação a características clínica, histopatológica e moleculares ao humanos, estudos referente ao tratamento hormonal é muito limitada nesta espécie (KUBOTA et al., 2016). Um estudo realizado por Tavares et al. (2010) em cães saudáveis demonstrou que o uso prolongado com tamoxifeno causaria a piometra, indicando a castração antes do uso medicamento, contudo mais estudos necessitariam ser realizados para demonstrar a eficácia do tamoxifeno em cadelas.

O uso da hormonioterapia em cadelas seria um tratamento muito vantajoso para esta espécie, uma vez que o câncer de mama canino é predominantemente positivo para ER, além disso o uso do tamoxifeno em comparação com a quimioterapia é muito conveniente para o proprietário, isso porque este medicamento ao contrário da quimioterapia é administrado de forma oral, além do mais ele é seletivamente citotóxico para o câncer mas não para as células normais como com a quimioterapia (KUBOTA et al., 2016). Devido a isso, o uso da hormonioterapia na clínica veterinária seria muito benéfica para os animais, contudo mais estudos sobre os medicamentos atuais necessitam ser realizados.

3.9. TRATAMENTO ALTERNATIVO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)

Apesar de todo avanço que a medicina e a ciência tiveram até o momento em relação ao câncer de mama, este continua sendo o tipo de tumor com maior frequência em todo mundo e de maior ocorrência entre as mulheres, com uma incidência que só vem aumentando nos últimos anos (FOSTER et al., 2017). Além disso, os tratamentos existentes atualmente não apresentam uma ação totalmente efetiva, com variáveis taxas de cura e muitos efeitos adversos. Devido a isso, países desenvolvidos têm investido em recursos financeiros em pesquisas e estratégias terapêuticas que sejam capazes de reduzir as recidivas dos tumores e a taxa de mortalidade (BONILLA et al., 2017; FOSTER et al., 2017).

Devido a todos os fatores mencionados acima, uma das abordagens mais recentes na terapia do câncer e mais especificamente no câncer de mama é o uso de células-tronco para eliminar as células tumorais. Nos últimos anos diversos estudos vêm demonstrando que as células-tronco mesenquimais (CTMs) tem uma inerente capacidade para migrar em locais que apresentam inflamação, lesão, isquemia e o mais importante microambiente tumoral (o que é conhecido como tropismo tumoral). O mecanismo das CTMs em relação ao tropismo tumoral, ainda não foi totalmente desvendado, embora já seja conhecido que a sinalização de citocinas é um regulador fundamental neste comportamento (MOMIN et al., 2010).

Diversos estudos apoiam o potencial terapêutico das CTMs no câncer de mama, por exemplo, em estudos *in vitro* desenvolvido por Ryu et al. (2014) demonstrou que CTMs de tecido adiposo cultivadas em alta densidade suprimiram o crescimento de células MCF7.

Da mesma forma, em um estudo de co-cultura de células de câncer de mama humano e CTMs derivadas de medula óssea foi observada uma inibição do crescimento celular (ZHOU et al., 2014). Em estudos *in vivo*, um modelo de xenoenxerto de câncer de mama MDA-MB-231, tratado com CTMs derivadas de cordão umbilical humano revelaram que as CTMs podem induzir apoptose e suprimir a angiogênese das células tumorais (LENG et al., 2014). Já em outro modelo pré-clínico de tumor de mama, as CTMs derivadas de placenta reduziram o crescimento e o desenvolvimento tumoral (VEGH et al., 2013).

Desta forma, o interesse pelo uso das CTMs na terapia do câncer aumentou a partir das descobertas que estas células podem entregar drogas anticâncer, sendo altamente seletivas superando o obstáculo da meia vida limitada das drogas, uma vez que as CTMs podem ser manipuladas para secretar a droga continuamente (EL-HAIBI; KARNOUB, 2010; SHAH, 2012). Além disso, tem a capacidade de suprimir a inflamação local (EL-JAWHARI et al., 2014) e promover o reparo e regeneração do tecido lesado (CLOVER et al., 2014; HANSON et al., 2014; LINERO; CHAPARRO, 2014), sem imunogenicidade e toxicidade ao hospedeiro (KAMDJE et al., 2014).

3.10 IMUNOMODULAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMS)

As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam esta imunogenicidade ao hospedeiro devido a sua interação com sistema imunológico de resposta inata e adaptativa o qual tem sido investigada *in vitro* por diversos autores (BARTHOLOMEW et al., 2002, KRAMPERA et al., 2003; AGGARWAL et al., 2005). As CTMs são células imunoprivilegiadas que parecem modular o sistema imune (DEANS; MOSELEY, 2000; KRAMPERA et al., 2003) tendo contato direto com células T (BARTHOLOMEW et al., 2002; LE BLANC et al., 2003, TSE et al., 2003; KRAMPERA et al., 2006; BENVENUTO et al., 2007; NASEF et al., 2007; SATO et al., 2007), células B (CORCIONE et al., 2006; RASMUSSEN et al., 2007), células natural killer (NK) (SPAGGIARI et al., 2006) e células dendríticas (DJOUAD et al., 2007).

Além disso, tal característica se deve também ao fato que as CTMs são caracterizadas pela baixa expressão de MHC classe I e pela ausência de moléculas como CD80, CD86 ou CD40 (KRAMPERA et al., 2003; JIANG et al., 2005), e também pela ausência da expressão de MCH classe II e de ativadores de linfócitos T. Elas até possuem algum nível de expressão de MHC classe II que podem ativar células T, mas que

paralelamente há falta de moléculas coestimuladoras que não conseguem provocar uma resposta imune (TSE et al., 2003).

Desta maneira, as células-tronco mediam os efeitos imunorreguladores na imunidade inata e adaptativa pela modulação da ativação e proliferação das células T, indiretamente através de fatores solúveis ou por contato físico direto independentemente do reconhecimento pelo MHC (LE BLANC et al., 2003; KRAMPERA et al., 2003). Em parte, também é possível explicar tal característica pela produção de citocinas como o fator estimulante de colônias de macrófagos, IL-6, IL-8, IL-12, fator de crescimento de hepatócitos, TNF-gama, interleucinas imunossupressoras 10 e TGF- β (NÉMETH et al., 2009).

A propriedade imunomoduladora apresentadas pelas células-tronco variam de acordo com a fonte de obtenção das mesmas bem como com o número de passagens em cultura, com a dosagem de administração e condição patológica do paciente (MA et al., 2014).

3.11 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA

Entre as muitas fontes de CTMs que foram identificadas, como células derivadas de medula óssea e tecido adiposo entre outros, as células derivadas da placenta e seus anexos tem atraído um interesse particular devido as suas características únicas relacionadas com o tecido, incluindo o seu elevado rendimento celular e ausência de expressão para antígenos contra leucócitos e moléculas co-estimuladoras. Além disso, estas células apresentam características básicas comuns às CTMs de outras fontes (BONOMI et al., 2015).

Dentre as células derivadas da placenta e de seus anexos, podemos destacar as derivadas da membrana amniótica (MA). Células-tronco de membrana amniótica possuem propriedades que as tornam adequadas para seu uso, como baixa imunogenicidade, promoção de epitelização, ação anti-inflamatória, anti-angiogênica, antimicrobiana e anticancerígena (SEO et al., 2008; RAMUTA; KREFT, 2018). Devido a todas as características mencionadas acima ela se tornou alvo de diversos estudos principalmente a MA humana (IN'T ANKER et al., 2004; PAROLINI et al., 2008; DIAZ-PRADO et al., 2011; PAROLINI et al., 2011) e canina (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012).

Sendo assim, foi hipotetizado que células de MA poderiam ter um efeito anticancerígeno (SEO et al., 2008; NIKNEJAD et al., 2012) e por isso estudos sobre seu

efeito em células tumorais surgiram. Jiao et al. (2011) demonstrou que células de MA humana inibiram o crescimento e induziram a apoptose de glioma *in vivo*. Já em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231) houve uma diminuição no crescimento destas células tumorais após a adição das células de MA (NIKNEJAD et al., 2014). Esta capacidade que as células de MA apresentam em reduzir o crescimento de células tumorais é atribuída a alguma substância que induz a parada do ciclo celular e é secretada pelas por essas células, de origem desconhecida até o momento, mas que vem sendo o alvo principal de estudos (MAGATTI et al., 2012).

Apesar de todo este potencial que células de MA apresentam para o tratamento contra o câncer, até o momento existem poucos estudos sobre seu efeito para o câncer mamário humano e ausência de estudos para o câncer mamário canino. Apenas recentemente Borghesi et al. (submetido) fez uso de células-tronco de membrana amniótica canina (AMC) em associação com o quimioterápico doxorrubicina para tratar as células de carcinoma inflamatório mamário canino (IPC-366) triplo negativo *in vitro*. Seus resultados demonstraram que o tratamento associação causou uma redução em proteínas relacionadas a proliferação celular e potencial angiogênico, porém seu principal achado foi a reversão positiva na expressão do receptor de estrógeno, fazendo com que o tumor passe a ser responsivo à hormonioterapia. Sendo assim encorajamos novos estudos com o uso destas células em câncer mamário humano e canino, afim de uma melhor compreensão sobre o real potencial dessas células.

3.12 CONCLUSÃO

Em resumo, demonstramos que o cão pode ser um modelo animal para o câncer de mama humano, uma vez que, apresenta características clínicas, histopatológicas e moleculares similares aos tumores em humanos, embora o tratamento clínico atual em ambos possua diferenças significativas. Assim acreditamos que pesquisas voltadas para a hormonioterapia e terapia dirigida na medicina veterinária são necessárias para melhorar o prognóstico e/ou qualidade de vida dos cães. Em contrapartida, os tratamentos atuais não apresentam cura definitiva, sendo necessária a implementação de novas abordagens terapêuticas. Nesse ponto de vista, novos tratamentos que usam células-tronco, como as derivadas da membrana amniótica, vêm demonstrando ser promissores devido a sua capacidade anti-inflamatória, antiangiogênica, antimicrobiana e anticancerígena.

REFERÊNCIAS

AFRICANDER, D.; STORBECK, K. Steroid metabolism in breast cancer: where are we and what are we missing? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.466, p.86-97, 2018.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, p.1815-1822, 2005.

AKA, J. A.; MAZUMDAR, M.; LIN, S. Reductive 17 β -hidroxisteroid dehydrogenases in the sulfatase pathway: critical in the cell proliferation of breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 301, p.183-190, 2009.

ANDERSON, W.F. **et al.** Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). **Breast Diseases**, v.22, p.9-23, 2005.

ASGEIRSSON, K.S. **et al.** Altered expression of E-cadherin in breast cancer: patterns, mechanisms and clinical significance. **European Journal Cancer**, v.36, p.1098–106,2000.

ALMENDRO, V.; MARUSYK, A.; POLYAK, K. Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annual Review of Pathology*, v.8, p.277-302, 2013.

BAIOCCHINI, A. **et al.** Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. **Plos One**, v.11, p.e 0151736, 2016.

BARRON, T. I. **et al.** A nested case–control study of adjuvant hormonal therapy persistence and compliance, and early breast cancer recurrence in women with stage I–III breast cancer. **British journal of cancer**, v. 109, n. 6, p. 1513, 2013.

BASSE, C.; AROCK, M. The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. **International Journal of Cancer**, v.137, p.2785–2794, 2015.

BARTHOLOMEW, A. **et al.** Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v.30, n.1, p.42-48, 2002.

BEHERA, P. Epigenetics changes in breast cancer: Current aspects in India. **Journal of Bioengineering & Biomedical Science**, v.7, p.223, 2017.

BENVENUTO, F. **et al.** Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. **Stem Cells**, v.25, p.1753-1760, 2007.

BERTUCCI, F. **et al.** Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. **Cancer Research**, v. 66, n. 9, p. 4636-44, 2006.

BONASSA, E.M.A. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 3th ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BONILLA, J. M.; TABANERA, M. T.; MENDOZA, L. R. El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. **Radiología**, v. 59, p. 368-379, 2017.

BONOMI, A. **et al.** Human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSCs) as potential vehicles for drug delivery in cancer therapy: an in vitro study. **Stem Cell Research & Therapy**, v.6, p.155, 2015.

BORGHESI, J. **et al.** (submetido). Effects of doxorubicin treatment at association of amniotic membrane stem cells and canine inflammatory mammary carcinoma cells (IPC-366).

BOSARI, S. **et al.** p53 immunoreactivity in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. **The Journal of Pathology**, v.169, p.425–430, 1993.

BOSE, S. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. **Oncogene**, v.17, p.123-127, 1998.

BOSE, S. **et al.** Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression. **Human Pathology**, v. 33, p.405–409, 2002.

BRITO, C. **et al.** Fatores associados à persistência à terapia hormonal em mulheres com câncer de mama. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 2, 2014.

CABRAL, A.H. **et al.** Tubular carcinoma of the breast: an institutional experience and review of the literature. **Breast Journal**, v.9, p.298-301, 2013.

CARDIFF, R. D.; KENNEY, N. Mouse mammary tumor biology: a short history. **Advances in Cancer Research**, v. 98, p. 53–116, 2007.

CARVALHO, M. **et al.** Câncer de mama: tratamento quimioterápico quimiopreventivo. **ANAIS V SIMPAC**, v. 5, p. 277-280, 2015.

CASSALI, G. D. **et al.** Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, p. 153- 180, 2011.

CAVALHEIRO, J.A. **et al.** Tratamento sistêmico adjuvante em câncer de mama. **Revista HCPA**, v.21, p. 2, 2001.

CHAKRABARTI, I **et al.** Inflammatory carcinoma of breast. **Archives of Medicine and Health Science**, v.5, p.255-257, 2017.

CHAN, M. **et al.** Outcomes of estrogen receptor negative and progesterone receptor positive breast cancer. **Plos One**, v.10, p. e0132449, 2015.

CHEANG, M.C.U. **et al.** Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.101, p.736-50, 2009.

CHIA, S. **et al.** Locally Advanced and inflammatory breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 786 – 790, 2008.

CHUANG, J. C.; JONES, P. A. Epigenetics and microRNAs. **Pediatric research**, v.61, p 24–29, 2007.

CHIU, C.J. **et al.** Interaction of collagen-related genes and susceptibility to betel quid-induced oral sub mucous fibrosis. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevntion**, v. 11, n. 7: p. 646-53. 2002.

CHU, L.L. **et al.** Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 50, p.11–25, 1998.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New molecular classifications of breast cancer. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.59, p.303-13, 2009.

CLOVER, A.J. **et al.** Allogeneic mesenchymal stem cells, but not culture modified monocytes, improve burn wound healing. **Burns**, v.41, p.548-57, 2014.

COBLEIGH, M.A. **et al.** A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. **Seminars in Oncology**, v.30, p.117–24, 2003.

CORCIONE, A. **et al.** Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v.107, p.367-372, 2006.

COX, R. Mechanisms of radiation oncogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, v. 65, p.57-64, 1994.

CROKER, A.K.; ALLAN, A.L. Cancer stem cells: Implications for the progression and treatment of metastatic disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.2, p.374–390,2008.

DALEY, W.P.; PETERS, S.B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science*, v.1, p.255-264, 2008.

DAWOOD, S. **et al.** International expert panel on inflammatory breast cancer: consensus statement for standardized diagnosis and treatment. *Annals of Oncology*, v.22, p.515-523, 2011.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, v.28, p.875-84, 2000.

DE CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer*, v.13, p. 97–110, 2013.

DEL DEBBIO, C. B.; TONON, L.M.; SECOLI, S.R.. Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v. 28, p.133-42, 2007.

DE MATOS, A.J. **et al.** MIB-1 labelling indices according to clinico-pathological variables in canine mammary tumours: a multivariate study. *Anticancer Research*, v 3A, p.1821-1826, 2006.

DEMASI, M. A. **et al.** **Genômica funcional do câncer**. In: Paulo Marcelo Gehm Hoff. (Org.). *Tratado de Oncologia* .São Paulo: Atheneu, 2013.

DEOCESANO-PEREIRA, C. **et al.** Post-transcriptional control of RNA expression in cancer. *Gene Expression and Regulation in Mammalian Cells* , 2017.

DERYUGINA, E.I.; QUIGLEY, J.P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, v.25, p. 9–34, 2006.

DIAB, S.G. **et al.** Tumor characteristics and clinical outcome of tubular and mucinous breast carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, v.17, p.1442-8,1999.

DISCHER, D.E.; MOONEY, D.J.; ZANDSTRA, P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, v.324, p. 1673–1677, 2009.

DI NICOLA, M. **et al.** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v.99, p.3838-43, 2002.

DÍAZ-PRADO, S. **et al.** Stem cells from human amniotic membrane. **Tissue Engineering: part C**, v. 17, p. 49-59, 2011.

DHANKHAR, R. **et al.** Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.**, v.38, p.230–249, 2010.

DJOUAD, F. **et al.** Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6- dependent mechanism. **Stem Cells**, v. 25, p.2025–2032, 2007.

DONEGAN, W.L. **et al.** Carcinoma of the breast in males: A multiinstitutional survey. **Cancer**, v.83, p.498-509, 1998.

DUNNWALD, L. K.; ROSSING, M. A.; LI, C. I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 9, n. 1, p. R6, 2007.

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, p. 1673–1681, 2004.

DWORKIN, A.M.; HUANG, T.H.; TOLAND, A.E. Epigenetic alterations in the breast: implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. **Seminars in Cancer Biology**, v.19, p.165–71, 2009.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP (EBCTG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15–year survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**, v.365, p.1687–1717, 2005.

EBBEN, J.D. **et al.** The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.14, p.621-32, 2010.

EHRlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, v.21, p. 5400–13, 2002.

EL-HAIBI, C.P.; KARNOUB, A.E. Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.15, p.399-409, 2010.

ESTELLER, M. **et al.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research*, v.61, p. 3225–3229, 2001.

ESTELLER, M.. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics*, v.8, p. 286–98, 2007.

ELSTER, N. **et al.** HER2-family signalling mechanisms, clinical implications and targeting in breast cancer. *Breast Cancer Research Treatment*, v. 149, p. 5-15, 2015

FEDKO, M.G. **et al.** Pure tubular carcinoma and axillary nodal metastases. *Annals of Surgical Oncology*, v. 17, p.338-42, 2010.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, v.4, p. 143–153, 2004.

FOSTER, S.A.; GALLOWAY, D. A. Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene*, v.12, p.1773–1779, 1996.

FREIHOFF, D. **et al.** Exclusion of a major role for the PTEN tumour-suppressor gene in breast carcinomas. *British Empire Cancer Campaign*, v.79 p. 754-758, 1999.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tube travel: The role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Research*, v.68, p.7247–7249, **2008**.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Archives*, v. 453, p. 123-132, 2008.

GEIGER, B.; YAMADA, K.M. Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.3, p. a005033, 2011.

GEYER, F.C.; MARCHIÒ, C.; REIS-FILHO, J.S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v.1, p.77-88, 2009.

GOLDSCHMIDT, M. **et al.** Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p.117–131, 2011.

GOMES, C. **et al.** Carcinoma inflamatório mamário canino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 171-174, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The hallmarks of cancer review. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.

HANCE, K.W. **et al.** Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: The surveillance, epidemiology, and results program at the national cancer institute. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, p. 966-975, 2005.

HANSON, S.; D'SOUZA, R.N.; HEMATTI, P. Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 20, p.2162-2168, 2014.

HARTWELL, L.; KASTAN, M. Cell cycle control and cancer. **Science**, v.266, p.1821–3, 1994.

HARVEY, J.A. **et al.** Unusual breast cancers: useful clues to expanding the differential diagnosis. **Radiology**, v.242, p. 683–694, 2007.

HERSCHKOWITZ, J.I. **et al.** Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v.8, p.76, 2007.

HERVIR, N. **et al.** Expression of estrogen and progesterone receptors and estrogen metabolizing enzymes in different breast cancer cell lines. **Chemico-Biological Interactions**, v. 191, p. 206-216, 2011.

HENRY, C.J. **Mammary cancer**. In: BONAGURA, J.D.; TWEDT, D.C. (éd): Kirk,s Current Veterinary Therapy XV. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2014.

HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, p.427-433, 2000.

HILTON, H.N.; GRAHAM, J.D.; CLARKE, C.L. Minireview: Progesterone regulation of proliferation in the normal human breast and in breast cancer: A tale of two scenarios?. **Molecular Endocrinology**, v.29, n.9, p.1230-1242, 2015.

HUANG, D. **et al.** Mechanisms of resistance to selective estrogen receptor down-regulator in metastatic breast cancer. **BBA – Reviews on Cancer**, v. 1868, p.148-156, 2017.

HUANG, Y. **et al.** Epigenetics in breast cancer: what's new? **Breast Cancer Research**, v.13, p.225, 2011.

HUMPHRIES, M.J.; NEWHAM, P. The structure of cell adhesion molecules. **Trends in Cell Biology**, v.8, p.78–83, 1998.

ILHAN, F.; METIN, N.; BIRINCIIOGLU, S.T. Immunohistochemical detection of PCNA and p53 in mammary tumours and normal tissues in dogs. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.159, p.298-304, 2008.

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41-55, 2016.

IN 'T ANKER, P.S. **et al.** Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v.22, p.1338–1345, 2004.

IRMINGER-FINGER, I.; JEFFORD, C. E. Is there more to BARD1 than BRCA1. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 382–391, 2006.

ISSA, J.P. Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. **Cancer Prevention Research**, v.1, p.219–22, 2008.

JIAO, H. **et al.** Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis in vivo through the Bcl-2/caspase pathways. **Molecular Biology Reports**, v.39, p.467–473, 2012.

JIANG, X.X. **et al.** Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte- derived dendritic cells. **Blood**, v.105, p.4120e6, 2005.

KAMDJE, A. H. N. **et al.** Mesenchymal stem cell therapy for breast cancer: Challenges remaining. **International Journal of Biomedical Science and Engineering**, v.2, p.20-24, 2014.

KANAE, Y. **et al.** Expression of the *PTEN* tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p.127-33, 2006.

KARICHEVA, O. **et al.** PARP3 controls TGF β and ROS driven epithelial-to-mesenchymal transition and stemness by stimulating a TG2-Snail-E-cadherin axis. *Oncotarget*, v.7, p. 64109–64123, 2016.

KAWALEC, P.; ŁOPUCH, S.; MIKRUT, A. Effectiveness of targeted therapy in patients with previously untreated metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Breast Cancer**; v.15, p.90-100, 2015.

KLEER, C.G.; VAN GOLEN, K.L.; MERAJVER, S.D. Molecular biology of breast cancer metastasis - Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. **Breast Cancer Research**, v.2, p.423-429, 2000.

KRAMPERA, M. **et al.** Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p.386-98, 2006.

KRAMPERA, M. **et al.** Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v.101, p.3722-3729, 2003.

KREEGER, P.K.; LAUFFENBURGER, D.A. Cancer systems biology: a network modeling perspective. *Carcinogenesis*, v.31, p. 2-8, 2010.

KENNECKE, H. **et al.** Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, p.3271-7, 2010.

KESSENBROCK, K.; WANG, C.Y.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. **Matrix Biology**, v. 44, p.184–190, 2015.

KUBOTA, L. E. **et al.** Carcinoma inflamatório de mama – uma abordagem comparada. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, p. 187-194, 2016.

LABELLE, M.; BEGUM, S.; HYNES, R.O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer Cell**, v. 20, p. 576–590, 2011.

LACROIX, M. **et al.** Gene regulation by phorbol 12-myristate 13-acetate in MCF-7 and

MDA-MB-231, two breast cancer cell lines exhibiting highly different phenotypes. **Oncology Reports**, v.12, p. 701-7, 2004.

LAKHANI, S.R. et al. **WHO classification of tumours of the breast**, 4 ed. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2012.

LANGEROD, A. et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v.9, p. R30, 2007.

LE BLANC, K. et al. Treatment of severe acute graft-versus host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cell. **Lancet**, v.363, p.1439-1441, 2003.

LEE, W.H.; BOYER, T.G. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. **Breast Cancer**, v.358, 2001.

LENG, L. et al. Molecular imaging for assessment of mesenchymal stem cells mediated breast cancer therapy. **Biomaterials**, v.35, p.5162-5170, 2014.

LI, H. et al. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. **Oncology Letters**, v. 14, p. 5865-5870, 2017.

LI, H.C. et al. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. **Breast Cancer Research Treatment**, v.88, p.75-85, 2004.

LINERO, I.; CHAPARRO, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PLoS.One**, v.9, p.e107001, 2014.

LIU, X.J.; SHEN, P.; WANG, X.F. Solitary adrenal metastasis from invasive ductal breast cancer: an uncommon finding: report of a case. **World Journal of Surgical Oncology**; v. 8, p.7, 2010.

LIVI, L. et al. Tubular carcinoma of the breast: outcome and loco-regional recurrence in 307 patients. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 31, p.9-12, 2005.

LO, P.K.; SUKUMAR, S. Epigenomics and breast cancer. **Pharmacogenomics**, v.9, p.1879-902, 2008.

LOBBA, A.R.M. **et al.** Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. **Cytometry Part A**, v.81, p.1084-1091, 2012.

LOBBA, A.R.M. **et al.** HIGH CD90 (THY-1) Expression positively correlates with cell transformation and worse prognosis in basal-like breast cancer tumors. **PLOS ONE**, v.13, p. E0199254, 2018.

LOUKOPOULOS, P. **et al.** Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p.382–394, 2003.

MA, S. **et al.** Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, v.21, p.216-225, 2014.

MAGATTI, M. **et al.** Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.16, p.1e11, 2012.

MAGNÉ, N. **et al.** Carciac toxicity assessment in locally advanced breast cancer treated neoadjuvantly with doxorubicin/paclitaxel regimen. **Support Care Cancer**, v.13, p. 819-825, 2005.

MALIK, R.; LELKES, P.I.; CUKIERMAN, E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. **Trends Biotechnology**, v. 33, p.230–236, 2015.

MARCONATO, L. **et al.** Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.235, p.967-972, 2009.

MARMÉ, F.; SCHNEEWEISS, A. Targeted therapies in triple-negative breast cancer. **Breast Care (Basel)**, v.10, p.159-166, 2015.

MARSH, D.J. **et al.** Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. **Human Molecular Genetics**, v.7, p.507-515, 1998.

MATSEN, C.B.; NEUMAYER, LA. Breast cancer: a review for the general surgeon. **JAMA Surgery**, v.148, p.971–979, 2013.

MAXIMIANO, S. **et al.** Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. **BioDrugs**, v. **30**, p.75-86, 2016.

MAYR, B. **et al.** Cytogenetic alterations in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 mutation in one mammary tumor from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p.69–78, 1998.

MCGUIRE, W. L. **et al.** Current status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Cancer**, v.39, p. 2934–47, 1977.

MISDORP, W. **et al.** **Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat.** In World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals, 2nd ed, Washington, 1999.

MILLER, K. **et al.** Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.357, p.2666–76, 2007.

MITTENDORF, E.A. **et al.** The neo- bioscore update for staging breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: Incorporation of prognostic biologic factors into staging after treatment. **JAMA Oncology**, v. 2, p.929-936, 2016.

MOASSER, M.M.; KROP, I.E. The evolving landscape of HER2 targeting in breast cancer. **JAMA Oncology**, v. 1, p.1154-1161, 2015.

MOMIN, E.M. **et al.** The oncogenic potential of mesenchymal stem cells in the treatment of cancer: directions for future research. **Current Immunology Reviews**, v. 6, p.137–148, 2010.

MORRIS, J. S. Genomic and proteomic profiling for cancer diagnosis in dogs. **Veterinary Journal**, v. 215, p. 101-109, 2016.

MORRIS, J.S.; DOBSON, J.M.; BOSTOCK, D.E. Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. **The Veterinary Record**, v.33, p.539-42, 1993.

MOURA-GALLO, C.V. **et al.** . Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro. **Revistas Brasileira de Epidemiologia**, v.7, p.167-175, 2004.

MOYA-HORNO, I.; CORTÉS, J. The expanding role of pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v.7, p.125–132, 2015.

MUELLER, F.; FUCHS, B.; KASER-HOTZ, B. Comparative biology of human and canine osteosarcoma. **Anticancer Research**, v.27, p.155-164, 2007.

NAKAGAWARA, A.; OHIRA, M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. **Cancer Letters**, v. 204, p. 213–24, 2004.

NASEF, A. **et al.** Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. **Gene Expression**, v.13, p. 217-226, 2007.

NATIONAL CANCER INSTITUTE 2015. 2012. In Inflammatory Breast Cancer. <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Sites-Types/IBC>. 2015.

NEMETH, K. **et al.** Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v.15, p.42e9, 2009.

NIELSEN, T.O. **et al.** Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v.10, p.5367-74, 2004.

NIKNEJAD, H. **et al.** Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. **Cytotherapy**, v.16, p.33e40, 2014.

NIKNEJAD, H.; KHAYAT-KHOEI, M.; PEIROVI, H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. **Medical Hypotheses**, v.78, p.690e1, 2012.

OCHIAI, K. **et al.** Cloning and sequencing full length of canine Brca2 and Rad51 cDNA. **The Journal of veterinary medical Science**, v.63, p.1103–8, 2001.

O'SHAUGHNESSY, J. **et al.** Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.364, p.205-214, 2011.

OVERGAARD, M. **et al.** Postoperative radiotherapy in high risk premenopausal women with breast cancer who receive adjuvant chemotherapy. **The New England Journal of Medicine**, v.337, p.949–55, 1997.

PAREDES, J. **et al.** Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1826, p.297–311, 2012.

PAREDES, J. **et al.** P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. **Virchows Arch**, v.450, p.73-80, 2007.

PAROLINI, O. **et al.** Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 300-311, 2008.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane. **Placenta**, v. 25, p. 186-195, 2011.

PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **Plos one**, v. 9, p. e44693, 2012.

PARKER, J.S. **et al.** Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v.27, p.1160-1167, 2009.

PRAT, A. **et al.** Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v.12, p.68, 2010.

PRAT, A. **et al.** Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. **Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, p. 203–9, 2013.

PEÑA, L. **et al.** Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.84, p.211–6, 2003.

PERREN, A. **et al.** Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. **American Society for Investigative Pathology**, v.4, p.1253-1260,1999.

PEROU, C.M. **et al.** Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p.747-52, 2000.

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

POIRIER, V. J. **et al.** Efficacy and toxicity of paclitaxel (taxol) for the treatment of canine malignant tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.18, p.219-22, 2004.

PROVENZANO, P.P. **et al.** Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v.4, p.38, 2006.

PUISIEUX, A.; BRABLETZ, T.; CARMEL, J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. **Nature Cell Biology**, v.16, p. 488–494, 2014.

QIU, C. **et al.** Expression and significance of PTEN in canine mammary gland tumours **Research in Veterinary Science**, v.85, p.383–388, 2008

RAKHA, E.A. **et al.** Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. **Journal Clinical Oncology**, v.28, p.99-104, 2010.

RAMUTA, T.Z.E.; KREFT, M.E. Human amniotic membrane and amniotic membrane–derived cells: How far are we from their use in regenerative and reconstructive urology? **Cell transplantation**, v.27, p.77–92, 2018.

RANGEL, M.M.M. **et al.** Eletroquimioterapia: uma nova promessa para o tratamento de cânceres em animais. **Clínica Veterinária**, v.75, p. 30-36, 2008.

RASMUSSEN, I. **et al.** Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.65, p.336-343, 2007.

REISENAUER, A. **et al.** Increased carcinogenic potential of myeloid tumor cells induced by aberrant TGF-beta1-signaling and upregulation of cathepsin B. **Biological Chemistry**, v.388, p.639-650, 2007.

RESSEL, L. **et al.** Reduced PTEN protein expression and its prognostic implications in canine and feline mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 46, p.860–868, 2009.

RIVERA, P. **et al.** Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research**, v.69, p. 8770-8774, 2009.

RYU, H. **et al.** Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN-beta and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Letters**, v.352, p.220-227, 2014.

ROBERTSON, F.M. **et al.** Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v.60, p.351-375, 2010.

RUBOVSKY, G.; HORVÁTH, Z. Recent advances in the neoadjuvant treatment of breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 20, p. 119-131, 2017

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Tumors of the mammary gland** In: MacEwen G.E; Whithrow, S.J. *Small Animal Clinical Oncology*. 3ed, Saunders Company, 2001.

SAHIN, A.A. **et al.** Global gene expression. changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. **The Cancer Journal**, v.8, p.461–468, 2002.

SATO, K. **et al.** Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v.109, p. 228-234, 2007.

SASSI, F. **et al.** Molecular-based tumour subtypes of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. **BioMedCentral Veterinary Research** , v.6, p.5, 2010.

SCHAFER, S.L. **Noções gerais de quimioterapia**. In: *Manual de Enfermagem oncológica*. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1996.

SHAH, K. Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.739–748, 2012.

SHARMA, G.N. **et al.** Various types and management of breast cancer: an overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v.1, p.109–126, 2010.

SHARMA, M. **et al.** Analysis of stromal signatures in the tumor microenvironment of ductal carcinoma in situ. **Breast Cancer Research Treatment**, v.123, p.397–404, 2010.

SELL, S. On the stem cell origin of cancer. **American Society for Investigative Pathology**, v.176, p.2584-94, 2010.

SEMENZA, G.L. The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.3, p.382-391, 2015.

SEO, J.; KIM, Y.; KIM, J. Properties of the amniotic membrane may be applicable in cancer therapy. **Medical Hypotheses**, v.70, p.812e4, 2008.

SLEECKX, N. **et al.** Canine mammary tumours, an overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.1112-1131, 2011.

SINGER, J. **et al.** Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. **Molecular Immunology**, v. 50, p.200-209, 2012.

SINGER, J. **et al.** Generation of a canine anti-EGFR (ErbB-1) antibody for passive immunotherapy in dog cancer patients. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, p.1777-1790, 2014.

SOLTANIAN, S.; MATIN, M.M. Cancer stem cells and cancer therapy. **Tumor Biology**, v.32, p.425-440, 2011.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.33, p.573-96, 2003.

SORENMO, K.U.; WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M.H. **Tumours of the mammary gland.** In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PAGE, R.L. (éd): Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th ed, Saunders/Elsevier Inc., St. Louis, Missouri, 2013.

SORLIE, T. **et al.** Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.8418-23, 2003.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal Cancer**, v. 40, p. 2667-75, 2004.

SOTIRIOU, C. **et al.** Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, p.10393-8, 2003.

SOUCHEK, J. J. **et al.** Combination treatment with orlistat-containing nanoparticles and taxanes is synergistic and enhances microtubule stability in taxane-resistant prostate cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, p.1819-1830, 2017.

SPAGGIARI, G.M. **et al.** Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. **Blood**, v.107, p.484-1490, 2006.

STINGL, J.; CALDAS, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nature Reviews Cancer**, v.7, p.791-9, 2007.

STIVAROU, T.; PATSAVOUDI, E. Extracellular molecules involved in cancer cell invasion. **Cancers**, v.7, p.238-265, 2015.

STUART-HARRIS, R.; ODELL, H.; STURGISS, E. Adjuvant chemotherapy for early breast cancer: is cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil still the standard? **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, v. 1, p.13–24, 2005.

SULLIVAN, A. **et al.** Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. **Oncogene**, v. 21, p.1316–1324, 2002.

SULLIVAN, T. **et al.** Tubular carcinoma of the breast: a retrospective analysis and review of the literature. **Breast Cancer Research Treatment**, v.93, p.199-205, 2009.

SWAIN, S.M. **et al.** Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.372, p.724-734, 2015.

TAMGUNEY, T.; STOKOE, D. New insights into PTEN. **Journal of Cell Science**, v.120, p.4071–4079, 2007.

TAVARES, W.L.F. **et al.** Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p.67, 2010.

TONG, J. **et al.** Over-expression of PTEN on proliferation and apoptosis in canine mammary tumors cells. **Animal Cells and Systems**, v. 20, p. 325–334, 2016.

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 17, p. 60, 2015.

TSE, W.T. **et al.** Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation** , v.75, p.389–97, 2003.

TURNER, N.C. **et al.** BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene**, v.29, p.2126-32, 2007.

UNSCEAR. **Sources and Effects of Ionizing Radiation**. Vol II, Effects. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 2000 Report to the General Assembly. United Nations, New York, 2000.

UNSCEAR. Sources and Effects of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 1993 Report to the General Assembly. United Nations, New York, 1993.

UPTON, A.C. Historical perspectives on radiation carcinogenesis. In UPTON,A.C.; ALBERT,R.E.; BURNS,F.J.; SHORE,R.E. (eds) **Radiation Carcinogenesis**. Elsevier, New York, 1986.

URANIO, M. F. **et al.** Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adneza: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matriz. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 361-373, 2011.

VAN DEN EYNDEN, G.G. **et al.** Overexpression of caveolin-1 and-2 in cell lines and in human samples of inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.95, p. 219-228, 2006.

VAN DER AUWERA, I. **et al.** Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. **Clinical Cancer Research**, v.10, p.7965-7971, 2004.

VAN DUURSEN, M. B. M. **et al.** Phytoestrogens in menopausal supplements induce ER-dependent cell proliferation and overcome breast cancer treatment in an in vitro breast cancer model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 269, p.132-140, 2013

VAN LEEUWEN, I.S. **et al.** P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. **Anticancer Research**, v.16, p. 3737–3744, 1996.

VAN UDEN, D. **et al.** Inflammatory breast cancer: An overview. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.93, p.116-126, 2015.

VEGH, I. **et al.** Decidua mesenchymal stem cells migrated toward mammary tumors in vitro and in vivo affecting tumor growth and tumor development. **Cancer Gene Therapy**, v.20, p.8-16, 2013.

VERMEULEN, P.; VAN-GOLEN, K.; DIRIX, L. Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge. **Belgian Journal of Medical Oncology**, v. 3, n. 2, p. 49-56, 2009.

VODUC, K.D. **et al.** Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, p.1684-91, 2010.

WALSHE, J.M.; SWAIN, S.M. Clinical aspects of inflammatory breast cancer. **Breast Disease**, v.22, p.35-44, 2005.

WEIGELT, B.; KREIKE, B.; REIS-FILHO, J. S. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 117, p. 273-80, 2009.

WELCSH, P.L.; KING, M.C. BRCA1 and BRCA2 and genetics of breast and ovarian cancer. **Human Molecular Genetics**, v.201, p. 705-713, 2001.

WHO, 2018 .<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>

WU, T.; DAI, Y. Tumor Microenvironment and Therapeutic Response. **Cancer Letters** , v.387, p.61-67, 2017.

WU, Y.; SARKISSYAN, M.; VADGAMA, J.V. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v.5, p. pii: E13, 2016.

YOSHIKAWA, Y. **et al.** Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, p.1323–8, 2008.

YOSHIKAWA, Y. **et al.** Effects of the missense mutations in canine BRCA2 on BRC repeat functions and comparative analyses between canine and human BRC repeat 3 . **PLoS One**, v.7,p. e45833, 2012.

ZHANG, H.Y. **et al.** PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients. **Oncology Letters**, v. 6, p.161-168, 2013.

ZHOU, Y.**et al.** Effect of truncated neurokinin-1 receptor expression changes on the interaction between human breast cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Genes Cells**, v. 19, p.676-91, 2014.

4. Artigo II - Células-Tronco Mesenquimais de Membrana Amniótica Canina: Isolamento, Caracterização e Diferenciação

Tissue and Cell - submetido em 27/12/2018

Jéssica Borghesi¹, Mariana Ferreira Lima², Lara Carolina Mario¹, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação¹, Ana Carolina Silveira Rabelo¹, Marcella Giancoli Kato Cano da Silva², Fausto Assunção Fernandes¹, Maria Angélica Miglino¹, Ana Claudia Oliveira Carreira^{1,3}, Phelipe Oliveira Favaron¹

¹Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil;

²Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, Brasil;

³NUCEL (Centro de Terapia Celular e Molecular) Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO: Nos últimos anos, o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) para tratamento terapêutico aumentou significativamente, porém muitos pontos sobre sua biossegurança precisam de explicação. Neste contexto, a membrana amniótica pode ser considerada como uma fonte de isolamento dessas células, além do mais por ser encontrada na interface materno fetal possui baixa imunogenicidade, podendo assim escapar do sistema imune. Portanto, nosso objetivo foi isolar, cultivar, caracterizar e diferenciar células derivadas da membrana amniótica canina (AMC) e verificar seu potencial imunológico e tumorigênico. Para isso, foram utilizados 12 fetos de cães com idade gestacional de 32, 43 e 55 dias. Após realizar o isolamento e cultura das células AMC, observamos que as mesmas apresentaram morfologia fibroblastóide e alta confluência mesmo após o congelamento. Observamos também que, quando induzidas, foram capazes de se diferenciar em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas, além de serem CD105 + e CD34-. Com relação aos marcadores imunológicos, verificamos que IL-1, IL-2, IL-6, IL-10 e MHC II não foram expressos, enquanto o MHC I foi expresso. Após a aplicação de células AMC em camundongos nude, podemos verificar que não houve formação de tumor. Com base nisso, concluímos que a membrana amniótica canina é uma fonte boa e acessível para obtenção de CTM de baixo potencial imunogênico e tumorigênico para aplicações terapêuticas veterinárias.

Palavras-chave: cultura celular; cão; placenta; potencial tumorigênico

4.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre células-tronco tem aumentado nos últimos anos, mas ainda há muito a ser descoberto sobre as características dessas células, não só relacionadas à sua morfologia, mas também relacionadas à sua funcionalidade, bem como ao seu real potencial de aplicação em medicina regenerativa (POUNTOS; GIANNOUDIS, 2005; BIANCO et al., 2008; NORBELA-ARRIETA et al., 2011). Além disso, estas células possuem imunofenótipo característico (DOMINICI et al., 2006), estando envolvidas em processos de reparo e reconstrução de tecidos lesionados podendo, assim, recuperar em diferentes níveis as funções locais ou fazer a substituição de células perdidas (FILIP et al., 2004).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com sua origem, sendo desta maneira classificadas como células-tronco fetais, embrionárias ou adultas (HUBNER et al., 2003). As vantagens das células-tronco fetais em relação às adultas e embrionárias deve-se a sua origem a partir de tecidos extraembrionários. As células-tronco fetais podem ser facilmente isoladas, graças ao grande volume desse tecido, que é de fácil acesso durante a manipulação física e, dessa forma, aumenta o número de células que podem ser isoladas. Ademais, tecidos extraembrionários são habitualmente descartados após o parto, ou seja, não há problemas éticos em relação ao seu uso (BRUNSTEIN; WAGNER, 2006; GOLDSTEIN et al., 2006).

Além disso, pelo fato de estarem na interface materno-fetal, tornam-se convenientes para os transplantes, pois apresentam baixa reação imunológica (LI et al., 2005; MIHU et al., 2009), apresentando características muito importantes, como baixa imunogenicidade e propriedades imunomoduladoras. Assim, quando as células são implantadas, elas apresentam mecanismos de defesa imunológica, reduzindo sua rejeição pelo organismo (LI et al., 2005).

Em 2011, Parolini e Caruso, descreveram o potencial para a aplicação clínica de células-tronco fetais da membrana amniótica humana. Estas células podem ser utilizadas para o tratamento de muitas doenças, especialmente aquelas associadas a processos degenerativos induzidos por processos inflamatórios e fibróticos. Há também relatos sobre as inúmeras vantagens do uso dessas células, como alta taxa de proliferação e potencial de diferenciação (CAI et al., 2004). Também foram descritas células-tronco da membrana amniótica de vários animais, como: gatos (VIDANE et al., 2011), cavalo (CREMONESI et

al., 2011; LANGE-CONSIGLIO et al., 2012; SEO et al., 2013), ovelhas (MAURO et al., 2010; ZHU et al., 2013), camundongos (MARCUS et al., 2008), coelho (Borghesi et al., 2017) e cães (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012).

Em cães, a membrana amniótica canina foi avaliada com 24-40 dias (URANIO et al., 2011) e 60-69 dias de gestação (PARK et al., 2012) mostraram capacidade de diferenciação e proliferação, porém em relação ao seu potencial tumorigênico nada foi descrito.

Até o momento, não há relatos na literatura sobre o potencial proliferativo e de diferenciação que essas células podem apresentar em diferentes períodos gestacionais, bem como o potencial tumorigênico real que essas células apresentam em ensaios *in vivo*. Então, muito pode ser dito sobre a capacidade dessas células em terapia celular e medicina regenerativa. Desta forma, o trabalho visa contribuir para um melhor aproveitamento e utilização das células amnióticas caninas, garantindo o uso seguro das mesmas na terapia celular em cães.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Animais Utilizados

Foram utilizados 12 fetos de cães com idade gestacional de aproximadamente 32 (n = 4), 43 (n = 4) e 55 (n = 4) dias. Os fetos foram coletados em campanha de castração realizada na cidade de Embu das Artes, São Paulo, Brasil. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (número do protocolo: 9077100215).

4.2.2. Cultura Celular de Membrana Amniótica Canina (AMC)

Depois de coletadas, as membranas amnióticas foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e antibiótico estreptomicina/penicilina a 5% (Invitrogen, Cat. 15140-122, Carlsbad, CA, EUA) e depositadas em placas de petri (Corning, Cat.3296, NY, EUA) onde a digestão enzimática usando colagenase tipo IV (Invitrogen 17018-029, Carlsbad, CA, EUA) foi realizada por 4 horas. Após a liberação das células, foi adicionado meio de cultura MEMAlpha (LGC Biotecnologia, Cat. BR3007-05, Cotia, São Paulo),

suplementado com 15% soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo), 1% de estreptomicina/penicilina, 1% de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01, Cotia, São Paulo) e 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich, Cat. S8636, St. Louis, Mo. EUA). As placas foram mantidas em estufa controlada a 37 °C, com umidade relativa de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Para todos os experimentos realizados, foram utilizadas as três idades gestacionais de 32, 43 e 55 dias de AMC.

4.2.3. Análise Morfológica

O crescimento e variações morfológicas das células foram observados usando microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100). As células foram avaliadas periodicamente até o congelamento, sendo possível observar e descrever as variações morfológicas durante seu crescimento.

4.2.4. Criopreservação Celular

As células foram congeladas em criotubos (Corning, Cat.430055, NY, EUA) com 1,5 mL de meio de congelamento contendo 90% de soro bovino fetal e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnologia, Cat. 13-0091.01, Cotia, São Paulo) . Após este procedimento, os criotubos foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidos em freezer a -80 °C durante a noite. Após 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados. Quando necessário, as células foram submetidas a rápida descongelação no banho de água a 37 °C.

4.2.5. Citometria de Fluxo

Para a análise imunofenotípica, utilizou-se o método de citometria de fluxo. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas com anticorpo primário (diluição de 1: 100) por 30 minutos a 4 °C. Após este tempo, as células foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição de 1: 500) durante 30 minutos a 4 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas pelo citômetro de fluxo FACS AriaII (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA). O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas e células

marcadas apenas com o anticorpo secundário não específico. Para cada amostra, 10.000 eventos foram contados. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD105 (ab53321, Abcam, Cambridge, UK), anti-CD34 (ab-8158, Abcam, Cambridge, UK), anti-CD117 (Dako, A4502), anti-PCNA (sc-46, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europe), anti-IL-1 (ab7632, Abcam, Cambridge, UK), anti-IL-2 (ab80681, Abcam, Cambridge, UK), anti-IL-6 (ab6672, Abcam, Cambridge, UK), anti-IL-10 (MCA2111B, AbD Serotec, Califórnia, EUA), anti-MHC-I (DG-BOV2001, Monoclonal Antibody Center Washigton, Washigton, EUA) e anti-MHC-II (DG-BOV2003, Monoclonal Antibody Center Washigton, Washigton, EUA).

4.2.6. Diferenciação Celular

Para diferenciação adipogênica e osteogênica, as células foram cultivadas em placas de 24 poços e induzidas com meio específicos de diferenciação adipogênica (StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit) (GIBCO Invitrogen, A1007001, Carlsbad, CA, EUA) e osteogênica (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit) (GIBCO Invitrogen, A1007201, Carlsbad, CA, EUA). As placas foram incubadas por 21 dias, em seguida fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com coloração de Von Kossa, utilizadas para a linhagem osteogênica e coloração de Oil Red para a linhagem adipogênica. Para a diferenciação condrogênica, as células foram ressuspensas em meio indutor condrogênico (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit A1007001 / GIBCO - cultura de células Invitrogen) e ressuspensas em tubo cônico de polipropileno e centrifugadas para a formação do botão celular que foi cultivado em estufa controlada. Após 21 dias, a amostra foi fixada em paraformaldeído a 4%, seguida de desidratação em sucessivos banhos de álcool de 50% a 100%, xilol e incluídos em paraplast. Secções de 5 µm foram cortadas e colocadas em lâminas de vidro e coradas com Hematoxilina-Eosina.

4.2.7. Potencial Tumorigênico

Para o potencial tumorigênico, as células de 32, 43 e 55 dias de gestação de AMC foram injetadas no membro pélvico direito de camundongos BALB/c nude por via subcutânea na região dorsal. A formação de tumores foi avaliada durante 8 semanas. Em seguida, os animais foram eutanasiados de acordo com as regras do comitê de bioética

(número do protocolo: 9077100215), e amostras de fígado, pulmão, rim, coração e pâncreas foram coletadas para observação histopatológica.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Isolamento, Morfologia e Criopreservação de Células de Membrana Amniótica Canina

Células de membrana amniótica canina com idade gestacional de 32, 43 e 55 dias foram isoladas por digestão enzimática com collagenase tipo I para obtenção de células-tronco mesenquimais. Foi observado um padrão no isolamento e cultivo das células nas diferentes idades gestacionais, sendo que 24 horas após a digestão enzimática já era possível visualizar um alto número de células aderentes com morfologia fibroblastóide, sendo caracterizada por núcleo centralizado e citoplasma alongado (Figura 1A-C). Em torno de 3 a 4 dias já era possível obter uma confluência de 80% de células em cultura, nesse momento algumas células foram expandidas para passagens posteriores e outras congeladas para o teste de criopreservação.

Para o teste de criopreservação, as células foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido por quinze dias e depois descongeladas. Após o descongelamento, as células apresentavam uma forma arredondada (Figura 1D-F) até o momento de sua adesão na placa onde retornavam para ter a mesma morfologia fibroblastóide e capacidade de proliferação (Figura 1G-I).

Figura 1: Análise morfológica de células-tronco de membrana amniótica canina aos 32, 43 e 55 dias de gestação.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Cultura de células primárias [A-C], sendo possível visualizar as células liberadas pelo explante celular (Ex) e posteriormente aderidas com formato fibroblastóide (seta). De [D-F] as células apresentam formato arredondo após o descongelamento. E de [G-I] visualizamos as células aderidas após 3 dias de descongelamento, mostrando uma alta confluência e o mesmo formato fibroblastóide que antes do congelamento (seta). A, D e G: 32 dias gestacionais; B, E e H: 43 dias gestacionais e C, F e I: 55 dias gestacionais.

4.3.2. Imunofenotipagem

Na imunofenotipagem foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar marcadores relacionados à caracterização de células tronco mesenquimais, células hematopoiéticas e precursoras hematopoiéticas, proliferação celular e marcadores imunológicos. A expressão de proteínas nas células AMC foi muito distinta em cada período gestacional.

Em relação às características mesenquimais, podemos observar que os animais de 43 dias apresentaram maior expressão de CD105 (97,2%) se comparados ao de 32 (91,9%) e 55 dias (46,9%) (Figura 2A-C). A capacidade de proliferação celular foi maior em 32 dias

de gestação (84,5%) se comparados aos 43 (81,9%) e 55 dias (46,9%) (Figura 2D-F). Em todos os tempos gestacionais (32, 43 e 55 dias) foi observada uma marcação reduzida para o marcador CD34 hematopoiético (2,86%, 2,25% e 0,14%, respectivamente) (Figura 2G-I). No entanto, para as células precursoras hematopoiéticas, pode-se notar que durante os dias houve uma diminuição na expressão de CD117 (92%, 83,2% e 60%) (Figura 2J-L).

Em relação ao perfil imunológico, ficou evidente a ausência de interleucinas IL-1 (1,65%, 1,22% e 0,93%), IL-2 (2,04%, 0,69% e 0,61%), IL-6 (0,97%, 0,33% e 1,46%) e IL-10 (3,48; 1,87 e 1,78) em todos os tempos gestacionais (Figura 3A-L). Já a expressão de MHC-I foi maior em 43 dias (59,9%) do que em 32 dias (30,3%) e 55 dias (32,3%) (Figura 3M-O). No entanto, nenhuma marcação foi observada para o MHC-II em qualquer idade gestacional (32, 43 e 55 dias) (3,04%, 1,84% e 3,45%, respectivamente) (Figura 3P-R).

Figura 2: Imunofenotipagem de células-tronco de membrana amniótica canina aos 32, 43 e 55 dias de gestação por citometria de fluxo.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-C] marcação para células mesenquimais (CD105), [D-F] proliferação celular (PCNA), [G-I] células hematopoiéticas (CD34) e [J-L] células precursoras hematopoiéticas (CD117). A, D, G e J: 32 dias gestacionais; B, E, H e K: 43 dias gestacionais e C, F, I e L: 55 dias gestacionais.

Figura 3: Imunofenotipagem de células-tronco de membrana amniótica canina aos 32, 43 e 55 dias de gestação por citometria de fluxo.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-C] marcação para IL-1, [D-F] IL-2, [G-I] IL-6 [J-L] IL-10, [M-O] MHC-I e [P-R] MHC-II. A, D, G, J, M e P: 32 dias gestacionais; B, E, H, K, N e Q: 43 dias gestacionais e C, F, I, L, O e R: 55 dias gestacionais.

4.3.3. Ensaio de Diferenciação Celular

Nas três linhagens celulares de AMC (32, 43 e 55 dias de gestação) foi observada uma alteração em sua morfologia celular após a indução da diferenciação. Na diferenciação adipogênica, as células apresentaram um formato mais arredondado, não mais possuindo o citoplasma tão alongado, apresentando também vesículas lipídicas (Figura 4A). Na diferenciação osteogênica as células perderam totalmente sua forma, sendo possível verificar apenas uma matriz extracelular com pontos de calcificação (Figura 4B). Finalmente, na diferenciação condrogênica, as células adquiriram o formato de condrócitos (Figura 4C).

4.3.4. Ensaio Do Potencial Tumorigênico

Após 8 semanas, os três camundongos nudes que receberam uma aplicação de AMC de 32, 43 e 55 dias de gestação, respectivamente, não apresentaram formação tumoral macroscópica. Assim, esses animais foram eutanasiados e o exame histopatológico dos principais órgãos vitais foi realizado. As análises histológicas do baço, coração, fígado, pulmão e rim apresentaram tecido intacto sem a presença de células metastáticas (Figura 4 D-I).

Figura 4: Diferenciação celular e avaliação do potencial tumorigênico de células-tronco de membrana amniótica com 32, 43 e 55 dias de gestação.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Em [A] diferenciação adipogênica, sendo possível verificar as de vesículas gordura (Vg). [B] diferenciação osteogênica, sendo possível observar a matriz extracelular (Mec) e os pontos de calcificação (Ca). [C] diferenciação condrogênica, visualizando células condrocitárias (Cc). A partir de [D-I] avaliação do potencial tumorigênico em camundongos nudes, [D] avaliação macroscópica do membro pélvico direito mostrando a ausência da formação tumoral. Em relação ao histopatológico [E] baço, [F] coração, [G] fígado, [H] pulmão e [I] rim, pode-se observar que houve preservação tecidual sem a presença de células metastáticas. Nota: fibras miocárdicas (Fm), hepatócitos (He), alvéolos (Al), túbulo contorcido proximal (Tcp) e túbulo convoluto distal (Tcd).

4.4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, muito se fala sobre os benefícios da medicina regenerativa, no entanto, ainda existem muitas lacunas em relação à resposta imune e tumoral que o hospedeiro pode desenvolver após a aplicação de células-tronco. Portanto, objetivamos avaliar se células isoladas de membrana amniótica canina podem ser classificadas como

células-tronco, além de sua capacidade imunogênica. Nós mostramos que as células derivadas de membrana amniótica canina (AMC) possuem características específicas de células-tronco, uma vez que mostraram marcação positiva para CTM e negativa para células hematopoiéticas, bem como capacidade de diferenciação nos três folhetos embrionários. Além disso, foi demonstrado pela primeira vez que as células AMC não apresentam potencial tumorigênico. Isso nos encoraja a continuar nossa pesquisa sobre seu potencial terapêutico *in vivo*.

A placenta tem origem no tecido extra-embrionário, apresentando um componente fetal e um componente materno. O componente fetal inclui a membrana amniótica (MA), que consiste em três camadas distintas: a monocamada epitelial, uma membrana basal e a matriz estromal avascular. Portanto, quando há interesse no estudo de um tipo específico de célula de MA, é importante saber como isolá-lo (SANE et al., 2018). Sabe-se que existe uma estreita relação entre o método de cultura primária e o fenótipo celular isolado de um tecido (PAROLINI et al., 2014). Foi demonstrado que a membrana amniótica humana submetida ao método de digestão mecânica para isolamento celular é eficaz e produz dois tipos de células: as células mesenquimais e as células epiteliais. Por outro lado, a digestão enzimática utilizando tripsina promove o isolamento das células epiteliais, enquanto a colagenase possibilita o isolamento das células mesenquimais (PAROLINI et al., 2008). Em nosso estudo, foram utilizadas membranas amnióticas de 32, 43 e 55 dias de gestação, pelo método da colagenase, permitindo o isolamento de uma cultura homogênea de células mesenquimais com formato fibroblastóide, característica desse tipo celular (BANIK et al., 2016).

Para a conservação de células-tronco, é essencial o uso do método de criopreservação, que é considerado seguro e eficaz (OTA et al., 2017). Portanto, o teste de criopreservação foi realizado com células isoladas da membrana amniótica, com congelamento seguido de descongelamento. Encontramos um resultado positivo, uma vez que as células continuaram com a mesma morfologia celular e confluência. Estes resultados concordam com Vidane et al. (2014) que demonstraram que as células da membrana amniótica isoladas de gatos também mantiveram as características morfológicas da cultura primária, além de terem a mesma capacidade de proliferar após o descongelamento. Esse aumento de proliferação, em nosso estudo, pode ser confirmado pelo aumento do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Pode-se enfatizar que isso foi altamente expresso em células AMC de 32 e 43 dias, com redução de 50% nas células de 55 dias.

No entanto, sabe-se que, após a criopreservação, a capacidade de diferenciação e imunomodulação celular pode estar comprometida (YONG et al., 2015). A capacidade de diferenciação celular é uma característica fundamental de uma célula-tronco (DOMINICI et al., 2006). Em nosso estudo, verificamos que mesmo após o descongelamento as células tiveram a capacidade de se diferenciar em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, após 21 dias submetidas ao meio indutor. Essa capacidade de diferenciação nos três folhetos embrionários também foi demonstrada em células isoladas da membrana amniótica de eqüinos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2011; SEO et al., 2012), bovinos (CAMPOS et al., 2017), humanos (PAROLINI et al., 2008), gato (VIDANE et al., 2014), coelho (BORGHESI et al., 2017) e cachorro (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012).

Outro fator importante a ser considerado na caracterização de células-tronco é sua marcação negativa para células hematopoéticas, como CD34, e positiva para CTM, como CD105 (DOMINICI et al., 2006; VIEIRA et al., 2010). Em nosso estudo, as células AMC não apresentaram marcação CD34 em nenhum tempo gestacional, resultado esperado, confirmando que as células isoladas não pertencem a uma linhagem hematopoiética. Uranio et al. (2011) também demonstraram que células isoladas de membrana amniótica canina de 25-40 dias de gestação não foram positivamente marcadas para CD34. Nós também mostramos que houve uma marcação positiva, com expressão acima de 90%, para CD105 em células AMC de 32 e 43 dias, no entanto, no tempo de 55 dias a expressão permaneceu abaixo de 50%. Park et al. (2012) encontraram 100% de marcação para CD105 em células isoladas de membrana amniótica canina a termo, entretanto, já foi demonstrado que células isoladas de membrana amniótica humana, apresentaram baixa expressão de CD105 (DIAZ-PRADO et al., 2011), justificando nossos achados com 55 dias. Em nosso estudo, também foi avaliada a marcação para células precursoras hematopoiéticas (CD117), onde encontramos uma alta expressão para este marcador. No entanto, esse achado não está de acordo com a literatura, uma vez que há relatos de que as células amnióticas devem ter pouca ou nenhuma marcação dessa proteína (ROUBELAKIS et al., 2012; BORGHESI et al., 2017).

A interação das CTM com o sistema imune de resposta inata e adaptativa tem sido investigada, uma vez que essas células são consideradas imunoprivilegiadas pela modulação do sistema imune (TSE et al., 2003; AGGARWAL et al., 2005). Assim, investigamos o perfil imunológico das células AMC, demonstrando resultados como baixa expressão de MHC-I e ausência de marcação para MHC-II em todos os tempos gestacionais. Jiang et al. (2005) e Krampera et al. (2006) encontraram baixa marcação para

MHC-I nos estudos de células-tronco mesenquimais usando células dendríticas e ósseas, respectivamente. Segundo Ramuta e Kreft (2017), as células mesenquimais de membrana amniótica expressam níveis de MHC-I baixos a moderados, enquanto não há expressão do MHC-II (MIKI et al., 2007; SONCINI et al., 2007; MARONGIU et al., 2010). A ausência de MHC-II confere às células-tronco mesenquimais o potencial de escapar do reconhecimento pelas células T CD4 +, conferindo-lhes uma imunogenicidade reduzida (MAJUMDAR et al., 2003; GOTHERSTROM et al., 2004).

Em nosso estudo, também observamos que não houve marcação com interleucina-IL-1, IL-2, IL-6 e IL-10 em células AMC em nenhum tempo gestacional Zaga et al. (2004) demonstraram que há um aumento na produção de IL-1 quando as células da membrana amniótica humana são estimuladas com *Escherichia coli* e lipopolissacarídeo. No entanto, sob condições basais, há pouca ou nenhuma produção desta interleucina, uma vez que não há necessidade de uma resposta inflamatória (ZAGA et al., 2004). Nos estudos realizados por Zaga-Clavellina et al. (2007), também foi observado que células de membrana amniótica humana fisiologicamente ativas praticamente não produzem IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, enquanto há um aumento dessas interleucinas quando estimuladas com *Escherichia coli*. Em nosso estudo, as células AMC utilizadas não estavam sob nenhum estímulo estressante, justificando a ausência destas interleucinas.

Finalmente, para uma célula-tronco ser usada com segurança, é necessário saber se há riscos de instabilidade genética, o que pode levar à tumorigênese (DIAFERIA et al., 2008). Cardoso et al. (2017) não encontraram formação tumoral após a injeção de células-tronco isoladas de membrana amniótica canina e felina de 35-45 dias de gestação. Sendo assim, avaliamos pela primeira vez o potencial tumorigênico de células-tronco isoladas da membrana amniótica canina em diferentes fases gestacionais. Após 60 dias, verificamos que não houve formação de tumor nos camundongos nude, em nenhum dos tempos gestacionais avaliados (32, 43 e 55 dias), mostrando que essas células são seguras para aplicação *in vivo*.

4.5. CONCLUSÃO

Em resumo, verificamos pela primeira vez que a membrana amniótica canina pode representar uma rica fonte de células-tronco com capacidade de se diferenciar em diferentes derivados mesenquimais e ser considerada imunogênica, uma vez que apresentou baixos índices de MHC-I e ausência de MHC-II. Além disso, a AMC não

apresentou potencial tumorigênico, tornando-se boas candidatas a serem utilizadas terapeuticamente em estudos de medicina regenerativa veterinária.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, p.1815-1822, 2005.

BANIK, B.L. **et al.** Human mesenchymal stem cell morphology and migration on microtextured titanium. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.4, p. 41, 2016.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts and assays. **Cell Stem Cells**, v.2, p.313-319, 2008.

BORGHESI, J. **et al.** Phenotype and multipotency of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) amniotic stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, p.27, 2017.

BRUNSTEIN, C.G.; WAGNER, J.E. Umbilical cord blood transplantation and banking. **Annual Review of Medicine**, v.57, p.403-417, 2006.

CAI, J.; WEISS, M.L.; RAO, M.S. In search of “stemness”. **Experimental Hematology** v.32, p.585-598, 2004

CAMPOS, L.L. **et al.** Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.278-286, 2017.

CARDOSO, M.T. **et al.** Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v.2, p.58-64, 2017.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. **Theriogenology**, v.75, n.1400-1415, 2011.

DIAFERIA, G.R. **et al.** Is stem cell chromosomes stability affected by cryopreservation conditions? **Cytotechnology**, v. 58, p.11–16, 2008.

DÍAZ-PRADO, S. **et al.** Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. **Differentiation**, v.81, p.162-71, 2011.

DOMINICI, M. **et al.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p. 315-317, 2006.

FILIP, S.; INGLÊS, D.; MOKRY, J. Issues in in stem cell plasticity. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, p. 572-577, 2004.

FRIEDENSTEIN, A.J. **et al.** Heterotropic of boné marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v.6, p.230-247, 1968.

GOLDSTEIN, G.; TOREN, A.; NAGLER, A. Human umbilical cord blood biology, transplantation and plasticity. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, p.1249-1259, 2006.

GOTHERSTROM, C. **et al.** Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.190, n. 239-245, 2004.

HORN, P.A. **et al.** Stem cell gene transfer-efficacy and safety in large animal studies. **Molecular Therapy**, v.10, p. 417-443, 2004.

HÜBNER, K. **et al.** Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. **Science**, v. 300, p. 1251–1256, 2003.

JIANG, X.X. **et al.** Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte- derived dendritic cells. **Blood**, v.105, p. 4120e6, 2005.

KRAMPERA, M. **et al.** Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, p.386-98, 2006.

LANGE-CONSIGLIO, A. **et al.** Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.6, p.622– 635, 2012.

LI, H. **et al.** Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.46, p. 900-907, 2005.

MAJUMDAR, M.K. **et al.** Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**, v.10, p.228-241, 2003.

MARCUS, A.J. **et al.** Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, v.76, p.130–144, 2008.

MARONGIU, F. **et al.** Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. **Current Protocols in Stem Cell Biology** v.1, n.5, 2010.

MAURO, A. **et al.** Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. **Veterinary Research Communication**, v. 34, p.S25–S28, 2010.

MIHU, C.M. **et al.** Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.50, p.73–77, 2009.

MIKI, T. **et al.** Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. **Journal of Reproductive Immunology**, v.75, p.91-96, 2007.

MORRISON, M. The dynamics of contemporary expectations in regenerative medicine. **Biosocieties**, v.7, n.3-22, 2012

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v.12, p.126-131, 2011.

OTA, A. **et al.** Stem cell keep™ Is effective for cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. **Cell Transplantation**, v.6, p. 773–787, 2017.

PARK, S.B.; SEO, M.S.; KIM, H.S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **Plos one**, v. 7, p.e44693, 2012.

PAROLINI, O. **et al.** Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v.26, p. 300-311, 2008.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane. **Placenta**, v. 25, p.186-195, 2011.

PAROLINI, O. **et al.** Therapeutic effect of human amniotic membrane-derived cells on experimental arthritis and other inflammatory disorders. **Arthritis Rheumatology**, v.66, p.327-39, 2014

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**, v.36, p. 8-12, 2008.

RAMUTA, T.Z.E.; KREFT, M.E. Human amniotic membrane and amniotic membrane-derived cells: How far are we from their use in regenerative and reconstructive urology? **Cell Transplantation**, v. 27, p.77–92, 2018.

ROUBELAKIS, M.G.; TROHATOU, O.; ANAGNOU, N.P. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: Marker discovery. **Stem Cells**, v.107836, p. 9, 2012.

SANE, M.S. **et al.** Biochemical characterization of pure dehydrated binate amniotic membrane: role of cytokines in the spotlight. **Regenerative Medicine** v,13, n. 689-703, 2018.

SEO, M.S. **et al.** Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v.14, p.151-159, 2013.

SONCINI, M. **et al.** Isolation and characterization of mesenchymal cells from human foetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.1, p.296–305, 2007.

TSE, W.T. **et al.** Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v.75, p.389–97, 2003.

URANIO, M.F. **et al.** Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adneza: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matriz. **Molecular Reproduction Development**, v.78, n. 361-373, 2011.

VIDANE, A.S. **et al.** Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **Stem Cells Cloning**, v.27, p.71-78, 2014.

VIEIRA, N.M. **et al.** Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v.19, p.279–289, 2010.

YONG, K.W. **et al.** Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: Current methods and challenges. **Biopreservation and Biobanking**, v.13, 2015.

ZAGA, V. **et al.** Secretion of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha by whole fetal membranes depends on initial interactions of amnion or chorion with lipopolysaccharides or group B streptococci. **Biology of Reproduction**, v.71, p. 1296-1302, 2004.

ZAGA-CLAVELLINA, V. **et al.** In vitro secretion profiles of interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, and TNF alpha after selective infection with Escherichia coli in human fetal membranes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.5, p.46, 2007.

ZHU, X. **et al.** Stem cell properties and neural differentiation of sheep amniotic epithelial cells. **Neural Regeneration Research**, v. 8, p.1210-1219, 2013.

5. Artigo III - O Papel da Matriz Extracelular no Carcinoma Mamário Tubular e Sólido

Veterinary and Comparative Oncology - submetido em 27/12/2018

Jéssica Borghesi¹, Marcella Giancoli Kato Cano da Silva², Katia de Oliveira Pimenta Guimarães¹, Lara Carolina Mario¹, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação¹, Ana Carolina Silveira Rabelo¹, Rafael Gonçalves Hayashi¹, Mariana Ferreira Lima², Maria Angélica Miglino¹, Ana Claudia Oliveira Carreira^{1,3}, Phelipe Oliveira Favaron¹

¹Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil;

²Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, Brasil;

³NUCEL (Centro de Terapia Celular e Molecular) Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO: O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, mas sua incidência em cadelas é três vezes maior. Entre os tumores mamários caninos que são mais frequentemente encontrados e se assemelham aos humanos estão dois tipos: o carcinoma tubular e o sólido. Esses dois tipos de carcinoma apresentam um importante grau de malignidade com capacidade de progressão tumoral. A matriz extracelular (MEC) terá papel importante nesse processo de progressão tumoral, pois atua como uma barreira física, impedindo a migração de células tumorais. Nesse sentido, propomos avaliar os componentes da MEC desses carcinomas. Para isso, foram utilizadas colorações específicas, como Tricrômico de Masson e Pricosirius Red, e a técnica de microscopia eletrônica de varredura, onde foi constatada a presença de fibras colágenas no carcinoma tubular ao redor do parênquima, em oposição ao sólido que apresentou fibras colágenas ao longo do parênquima em torno de cada célula tumoral. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou predominantemente a presença de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. Por fim, avaliamos a expressão de proteínas por imunohistoquímica, onde encontramos alta expressão de VEGF, PCNA, CK-18 e vimentina no carcinoma sólido. E um padrão positivo de marcador no carcinoma tubular e sólido para colágeno I, III e fibronectina. Assim, concluímos que o maior grau de malignidade do carcinoma sólido está relacionado com suas características histológicas e com os componentes presentes em sua matriz extracelular como a expressão de colágeno III, fibronectina, VEGF e PCNA,

Palavras-chave: cão; extracelular matriz; glândula mamária; modelo animal; patologia

5.1. INTRODUÇÃO

A neoplasia é caracterizada por uma diminuição da diferenciação e adesão, bem como proliferação celular descontrolada e contínua, mesmo quando o estímulo causador é interrompido (DALECK et al., 2008; MORRIS et al., 2016). Em 2015, aproximadamente 9 milhões de mortes ocorreram como resultado de câncer, com uma estimativa de 27 milhões de novos casos em 2030 na população mundial (WHO, 2018). O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, mas sua incidência em cadelas é três vezes maior. Estudos mostraram que há semelhança entre tumores caninos e humanos devido ao seu comportamento biológico, características histológicas e sua resposta a agentes citotóxicos (MOE, 2001; RUTTEMAN et al., 2001; DUTRA et al., 2004).

A classificação desses tumores é de extrema relevância, sendo baseada no tipo de organização tecidual e no grau de malignidade, recebendo diferentes denominações (MATOS et al., 2005; PACHNICKI et al., 2012). Assim, a histopatologia representa o método diagnóstico padrão-ouro para classificar e fornecer informações prognósticas em cães com câncer de mama (RASOTTO et al., 2017). Tumores que são mais diferenciados ao ponto em que não são reconhecidos por origem no tecido, os mais invasivos e metastáticos são aqueles classificados como malignos (ZACHARY; MCGAVIN, 2013). Essa capacidade de invadir outros tecidos ocorre devido a uma interação complexa entre vários fatores produzidos pelo tumor e a resposta do hospedeiro (JIANG et al., 2015).

A matriz extracelular (MEC) desempenha um papel importante na progressão tumoral, uma vez que atua como uma barreira física, impedindo a migração de células tumorais para novos tecidos (ALBERTS, 1997; SOTTILE; HOCKING, 2002). Para o processo de metástase, é necessária uma desorganização da estrutura da MEC, sendo as metaloproteinases (MMPs) e angiogênese importante neste processo (LIOTTA, 1986; WILSON et al., 1999; CURRAN ; MURRAY, 2000; MIRSHAFIEY et al., 2004).

Entre os tumores malignos que apresentam capacidade de progressão tumoral, destacam-se dois tipos de carcinoma, o carcinoma tubular e o carcinoma sólido. O carcinoma tubular tem um importante grau de malignidade, no entanto, o carcinoma sólido é considerado de pior prognóstico, e geralmente é visto em tumores altamente desenvolvidos que não houve tentativa de tratamento (MISDORP et al., 1972; CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2011; TAVASOLY et al., 2013). Além disso, os tumores mamários caninos têm analogia com os tumores mamários humanos, o que os

torna um importante modelo de estudo comparativo (GOBBI, 2002; ZUCCARI et al., 2004)

Devido a essa semelhança, o estudo em modelos animais, principalmente em cadelas, é essencial, pois esta espécie é considerada um modelo animal natural para o estudo do câncer de mama humano, bem como para testar novos fármacos e modalidades preventivas em testes pré-clínicos (REZAIE et al., 2009; CASSALI et al., 2011; RIVERA; VON EULER, 2011). Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização histopatológica de carcinomas tubulares e sólidos, a fim de melhor compreender sua composição celular e sua matriz extracelular.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Animais

Fragmentos de carcinomas tubulares e sólidos da mama e glândulas mamárias normais (saúdáveis) de cadelas foram coletados em campanhas de castração realizadas na cidade de Embu das Artes-SP. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o número 4800091215.

5.2.2. Análise Histopatológica

Para estudos histológicos, fragmentos de carcinomas e glândula mamária normal foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%. Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato salino (PBS), seguido de desidratação em uma série de etanol em concentrações crescentes (de 70 a 100%), seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina (Histosec) (TOLOSA, 2003). A seguir, os blocos de parafina foram submetidos à microtomia em micrótomo automático (Leica, RM2165, Alemanha), obtendo-se cortes de 5µm, que foram aderidos em lâminas histológicas e deixados em estufa a 60 ° C. Após serem desparafinizados os cortes foram corados seguindo-se técnicas rotineiras de coloração de tecido, usando a coloração de Hematoxilina e Eosina, Tricrômio de Masson e Pricosirius.

5.2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para esta técnica, as amostras de carcinoma foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%. Posteriormente foram submetidos à digestão da matriz celular para manutenção da arquitetura da matriz extracelular. A maceração foi realizada em solução aquosa a 10% de NaOH a temperatura ambiente por 25 dias, após o material foi lavado por 10 dias em água destilada à temperatura ambiente (OHTANI, 1987). E então o material foi impregnado em ácido tânico a 1% por 2 horas e pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% por 3 horas. As amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido e fraturadas após desidratação contínua em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Finalmente, elas foram desidratadas para secar no ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente, o material foi colocado em suporte metálico dourado ("sputtering" Emitech K550). Para observar os resultados, foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

5.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para análise ultraestrutural, fragmentos de carcinomas e glândula mamária normal com cerca de 0,5 cm² foram fixados em glutaraldeído a 2,5%, tamponados com fosfato sódico 0,1M e pH 7,4. A técnica realizada no processamento do material foi a mesma utilizada por IGLESIAS et al. (2017). O material foi analisado utilizando um microscópio electrónico de transmissão (Morgagni 268D, FEI Company, Holanda, câmara MegaView III, Soft Imaging, Alemanha).

5.2.5. Imunohistoquímica

Fragmentos de carcinomas e glândulas mamárias normais foram submetidos à técnica imunohistoquímica, utilizando-se anticorpos primários envolvidos com: transição epitelial-mesenquimal: vimentina (sc-73259, Santa Cruz Biotecnologia, Inc, Europe) e citoqueratina-18 (sc-32329, Santa Cruz Biotecnologia, Inc, Europe), proliferação celular: PCNA (sc-46, Biotecnologia Santa Cruz, Inc, Europe), morte celular: caspase-3 (ab2171, Abcam, Cambridge, UK), angiogênese: VEGF (ab2349, Abcam, Cambridge, UK) e proteínas de matriz: colágeno I (Rockland600-401-103S), colágeno III (Quartett 1-CO078-05), elastina (ab-9519, Abcam, Cambridge, UK) e fibronectina (NBP1-91258F). A técnica

utilizada seguiu o protocolo descrito por Oliveira et al. 2012. O controle negativo das reações imunohistoquímicas foi realizado usando IgG (IgG-AP 308F, 116 Chemical International).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Classificação Histopatológica

A análise macroscópica da glândula mamária normal foi realizada, sendo que não foi encontrada alterações morfológicas (Figura 1A). Na análise histopatológica foi possível visualizar uma arquitetura glandular, sendo esta caracterizada por unidades maiores denominadas lobos, as quais se encontravam separadas por tecido conjuntivo interlobular, que se subdividiam em lóbulos formados por ductos galactóforos, separados estes por septos de tecido conjuntivo intralobular (Figura 1B). Na técnica de tricrômio de masson e de picrosírius red, foi evidenciado em azul e verde respectivamente as fibras de colágeno entre e ao redor dos lobos (Figura 1C e 1D).

Em seguida, os tumores coletados também foram analisados, e observou-se que o carcinoma tubular apresentava 4,2 e 4,0cm de comprimento e largura, respectivamente (Figura 1E). Pela análise histopatológica, o carcinoma tubular apresentava uma cápsula em torno da qual penetrava seu parênquima, formando as trabéculas que delimitavam as células dispostas tubularmente. Além disso, caracterizando o processo de neoplasia maligna, podemos observar uma moderada celularidade e pleomorfismo nuclear e celular. Observou-se também a presença de grande quantidade de infiltrado inflamatório mononuclear organizado em blocos por vez perivascular e também a presença de baixo índice mitótico. Após análise, esse tumor pode ser classificado como carcinoma tubular grau II (pontuação 6 de Nottingham) (Figura 1F). O colágeno presente nesse tumor foi encontrado formando sua cápsula e suas ramificações que adentravam no parênquima tumoral (Figura 1G e 1H).

Em seguida, analisou-se o carcinoma sólido, que apresentava 9,1cm de comprimento e 8,0cm de largura (Figura 1I). Na análise histopatológica, observou-se a presença de uma cápsula ao redor, com parênquima homogêneo, diferente do carcinoma tubular. O tecido apresentou alta celularidade com arranjo sólido, além de um moderado pleomorfismo celular e nuclear. Um infiltrado inflamatório mononuclear peritumoral e um

baixo número de mitoses também foram observados. Posteriormente, as análises classificaram esses tumores como carcinoma sólido, grau II (pontuação de Nottingham 6) (Figura 1J). O colágeno presente nesse tipo de carcinoma era pericelular, sustentando as células neoplásicas (Figura 1K e 1L).

Figura 1: Classificação histopatológica e análise de colágeno.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-D] glândula mamária normal onde a presença de lobos (L) é observada; de ductos galactóforos (Dg), tecido conjuntivo interlobular (Ti) e fibras de colágeno (Fc). [E-H] carcinoma tubular, mostrando parênquima (P) e fibras de colágeno (Fc). [I-L] carcinoma sólido, onde observamos fibras de colágeno (Fc) e mitose celular (Mi). A, E e I: foto macroscópica; B, F e J: Coloração com hematoxilina e eosina; C, G e K: Tricrômico de Masson; D, H e L: Pricosirius Red.

5.3.2. Avaliação da Arquitetura das Fibras de Colágeno

Através da digestão da matriz extracelular utilizando solução aquosa a 10% de NaOH à temperatura ambiente por 25 dias, foi possível analisar a arquitetura das fibras colágenas presentes nos carcinomas. Nos carcinomas tubulares, as fibras estavam presentes na cápsula do tumor e também em pequenas ramificações que adentravam o parênquima. Foi possível notar que as fibras de colágeno eram espessas com diâmetro semelhante entre elas e dispostas em forma tubular, como observado na histologia (Figura 2A e B). No

carcinoma sólido, a maioria dos colágenos foi encontrada no parênquima tumoral ao redor das células neoplásicas e uma parte menor em sua cápsula. As fibras apresentavam espessura mais fina quando comparadas às fibras do carcinoma anterior (Figura 2C).

Figura 2: Análise por microscopia eletrônica de varredura do carcinoma tubular e sólido

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A e B] representam o carcinoma tubular, onde se observam espessas fibras de colágeno (Fc), estando dispostas de forma tubular (T). Em [C], o carcinoma sólido contendo finas fibras de colágeno (Fc) é observado formando um emaranhado.

5.3.3. Análise Ultraestrutural

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) observamos a estrutura normal do tecido glandular mamário, sendo este caracterizado pela presença de vacúolos no citoplasma (Figura 3A). No citoplasma foi possível observar grandes quantidades de células lipídicas com núcleos periféricos achatados (Figura 3B). O tecido apresentava mitocôndrias intactas (Figura 3C) e grandes quantidades de fibras de colágeno (Figura 3D).

Quanto ao carcinoma tubular, foi possível analisar a deformidade evidente de uma célula tumoral, além do contato íntimo de uma célula com a outra e o limite entre elas. Uma grande quantidade de cromatina dispersa no núcleo também foi observada (Figura 3E). Na periferia do citoplasma, o retículo endoplasmático granular foi encontrado com vacúolos citoplasmáticos (Figura 3F). Neste tipo de carcinoma pode-se visualizar essa que as mitocôndrias se encontravam rompidas perdendo sua morfologia (Figura 3G) diferente da glândula normal em que estas organelas estavam integras. Nessa técnica, assim como nas demais, foi possível verificar a presença de fibras colágenas, que entraram no parênquima tumoral (Figura 3H).

O carcinoma sólido mostrou um citoplasma amplamente ocupado pelo núcleo e com vesículas elétron-densas (Figura 3I). Como no carcinoma tubular, a cromatina dispersa no núcleo também é observada. Este tumor apresentava grânulos secretórios da proteína do leite com uma membrana irregular (Figura 3J). Observamos também a presença de muitas mitocôndrias intactas atuando diretamente na atividade tumoral (Figura 3K). As fibras de colágeno presente neste tecido eram abundantes, dando estrutura ao tumor (Figura 3L).

Figura 3: Análise ultraestrutural da glândula mamária e do carcinoma tubular e sólido.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-D] glândula mamária normal; [E-H] carcinoma tubular; [I-L] carcinoma sólido. A presença de vacúolos (V), núcleos periféricos (N), vesículas lipídicas (VI), mitocôndrias (M), fibras colágenas (Fc), vacúolos citoplasmáticos (Vc), retículo endoplasmático granular (Rg), cromatina dispersa (C) e grânulos secretórios (Gs) foram observados.

5.3.4. Análise Imunohistoquímica

Os dados mostraram que ambos os carcinomas tubular e sólido tinham superexpressão de PCNA (Figura 4 A-C) indicando uma taxa de proliferação mais alta do que a glândula normal. Pode-se notar também que tanto os carcinomas quanto a glândula normal foram positivos para a caspase-3. No entanto, os carcinomas apresentaram superexpressão desse marcador (Figura 4 D-F). Observa-se ainda que o citoesqueleto marcado pelo CK-18 da glândula mamária normal é interlobular, enquanto o carcinoma tubular está presente nos feixes que separam o parênquima tumoral. Em contraste, no carcinoma sólido, o citoesqueleto é encontrado entre as células. Nos três casos, houve uma coincidência com a marcação de CK-18 com o colágeno observado pela coloração de Trichomon de Masson (Figura 4 G-I). Em relação à vimentina, foi possível observar que a glândula normal, assim como os carcinomas, apresentaram coloração positiva, sendo maior no carcinoma sólido (Figura 4 J-L). Observamos também que houve marcação intensa e moderada do VEGF no carcinoma sólido e tubular, respectivamente, em relação à glândula normal (Figura 4 M-O). Para o colágeno I, tanto a glândula mamária normal quanto os carcinomas tinham marcação fraca (Figura 4 P-R). Em contraste tanto com o colágeno III (Figura 4 S-U) quanto com a fibronectina (Figura 4 V-X), os carcinomas apresentaram maior expressão em relação à glândula mamária normal.

Figura 4: Análise de Imunohistoquímica do tecido mamário canino.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Análise dos marcadores PCNA, caspase-3, CK-18, vimentina, VEGF, colágeno I, colágeno III e fibronectina por imunohistoquímica. A, D, G, J, M, P, S, V: glândula normal; B, E, H, K, N, Q, T, W: carcinoma tubular; C, F, I, L, O, R, U, X: carcinoma sólido.

5.4. DISCUSSÃO

O câncer de mama é o tumor mais comum na cadela, emerge por um processo de múltiplas etapas, que pode ser amplamente equacionado à transformação de células normais através das etapas de hiperplasia e alteração maligna (BECKMANN et al., 1997; KARAYANNOPOULOU et al., 2005). Vários estudos reconheceram alguns fatores prognósticos confiáveis, como tamanho do tumor, tipo histológico, grau e estado do linfonodos (GAMA et al., 2008). Desta forma, este estudo tem como objetivo caracterizar histopatologicamente o carcinoma tubular e o sólido, enfocando em sua matriz extracelular (MEC).

Um grande problema na avaliação de neoplasias mamárias caninas é identificar as neoplasias que são verdadeiramente malignas. Portanto, alguns critérios baseados na análise histopatológica são muito importantes para o diagnóstico de tumores mamários malignos. Em nossas análises, observamos que no carcinoma tubular, as células se organizavam tubularmente com um certo grau de pleomorfismo nuclear, além de mitoses atípicas, características de uma célula tumoral (CASSALI et al., 2011; ZACHARY; MCGAVIN, 2013). Além disso, outra característica observada nesse tipo de carcinoma foi a formação de cápsulas e feixes dividindo o parênquima tumoral e a presença de infiltrado inflamatório. Nossos resultados mostraram que no carcinoma tubular as células são predominantemente dispostas de forma tubular e o estroma intertubular é constituído por vasos e fibroblastos, e pode haver um infiltrado por plasmócitos, linfócitos e macrófagos, como descrito por Goldschmidt et al. 2011 . No carcinoma sólido, Goldschmidt et al. (2011) descreveram esse tumor como composto de células intimamente compactadas capazes de formar lóbulos de tamanho irregular e densos, apoiados por um fino estroma fibrovascular. Essas mesmas características foram observadas em nossos resultados, como uma cápsula ao redor do tumor, e pleomorfismo celular e nuclear moderado, além de infiltrado inflamatório mononuclear peritumoral.

Além do entendimento das características quanto ao tipo histológico, é necessário o conhecimento sobre a MEC dos tumores mamários, a fim de estabelecer a relação entre

seus componentes e as células neoplásicas, além de fornecer informações sobre o comportamento biológico (LOPES et al., 2017). Assim, avaliando-se as MEC dos carcinomas, encontramos o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), com superexpressão no carcinoma sólido em relação ao tubular. Essa diferença na expressão dos carcinomas foi semelhante aos resultados de Amitkumar et al. (2017) que demonstraram uma associação significativa do PCNA com o grau histológico no câncer de mama. Essa associação ocorre porque o PCNA atua e coordena uma ampla gama de processos envolvidos na manutenção, duplicação do genoma e regulação do ciclo celular, fazendo proliferar células malignas (YIN et al., 2017). Podemos também associar essa capacidade proliferativa à integridade das mitocôndrias presentes no citoplasma celular. No carcinoma sólido, a membrana mitocondrial foi preservada, permitindo que ocorresse oxidação de glicose e lipídios (BELORIBI-DJEFAFLIA et al., 2016), fazendo com que não houvesse assim interferência na atividade metabólica da célula tumoral. Ao contrário do carcinoma tubular onde sua membrana mitocondrial se encontrava rompida, o que pode levar a uma diminuição da atividade metabólica, resultando em uma redução na atividade proliferativa das células (KIEBISH et al., 2008; BELORIBI-DJEFAFLIA et al., 2016), justificando assim as diferenças encontradas no PCNA.

Além disso, um fator importante na compreensão da malignidade está relacionado ao processo metastático, que ocorre pela formação de novos vasos sanguíneos nos tumores para a disseminação das células neoplásicas. Esse processo é chamado de angiogênese, que pode ser evidenciada pela presença da proteína do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BAKRANIA et al., 2017). Verrax et al. (2011) relataram a presença de níveis elevados de VEGF no câncer de mama, como demonstrado em nossos resultados que essa proteína é muito evidente em ambos os carcinomas com superexpressão, especialmente no carcinoma sólido. Nossos resultados se assemelham ao estudo realizado por Restucci et al. 2002, onde eles obtiveram o mesmo padrão com maior expressão no carcinoma sólido do que no carcinoma tubular.

Outro fator importante associado invasão da MEC por células tumorais é sua através das alterações na orientação das fibras colágenas em sua matriz (PROVENZANO et al., 2006; HANA et al., 2016). Assim, quando analisamos as fibras colágenas, observamos que no carcinoma tubular elas foram organizadas ao redor do parênquima tumoral, enquanto no carcinoma sólido elas foram encontradas ao redor de cada célula do parênquima, demonstrando o maior potencial de metástase do carcinoma sólido. Este fato se deve, porque quanto maior a quantidade de colágeno ao redor da célula, maior a força

contrátil desta célula, gerando uma grande probabilidade de disseminação celular e reorganização da estrutura do citoesqueleto com infiltração no estroma denso (HANA et al., 2016).

Além do que foi descrito acima, a progressão metastática no câncer de mama também pode estar relacionada à transição epitelial-mesenquimal (TEM) (SHINDE et al., 2018), que é um processo crítico que envolve regulação negativa de marcadores epiteliais (ZHANG et al., 2017). A citoqueratina 18 (CK-18), um marcador de células epiteliais luminais, tem sido associada ao prognóstico de pacientes com câncer, e sua perda está associada a um mau prognóstico do câncer de mama (YANG et al., 2018). A vimentina, por sua vez, é um importante marcador de células mesenquimais, e sua expressão no câncer de mama tem sido associada a baixo grau histológico e alta fração de crescimento (WILLIPINSKI-STAPELFELDT et al., 2005). Sendo assim, demonstramos que o carcinoma tubular apresenta maior predominância de CK-18 e vimentina em sua cápsula; em contraste, o carcinoma sólido mostrou essa marcação em todo o tecido e, além disso, uma superexpressão de vimentina. Com base nesses resultados, podemos inferir que a TEM é mais proeminente no carcinoma sólido do que no carcinoma tubular, o que é consistente com o aumento da agressividade do carcinoma sólido.

Outro evento crítico no início e durante a progressão do tumor é o processo de apoptose (EVAN; VOUSDEN, 2001). Em nosso estudo, obtivemos uma maior expressão de caspase-3 em carcinomas tubulares e sólidos quando comparados à glândula normal. Isso se deve ao fato de os carcinomas mamários apresentarem lesões de alto grau, exibindo um índice apoptótico maior do que as lesões de baixo grau (VAKKALA et al., 1999), embora a capacidade de evitar a apoptose possa ajudá-los a romper os mecanismos de defesa anti-neoplásica (DEVARAJAN et al., 2002). Provavelmente, por esses tumores serem do tipo carcinomas, e, portanto, malignos, está ocorrendo um aumento da apoptose.

Finalmente, nossos estudos revelaram a presença de um retículo endoplasmático rugoso em ambos os carcinomas, e sua presença está associada à produção e síntese de colágeno, que é um dos componentes mais abundantes e importantes devido à sua função de suporte da MEC (BATEMAN et al., 2009). Nós demonstramos que houve uma baixa expressão de colágeno I em ambos os carcinomas, corroborando com outros estudos que demonstraram que tumores no estágio I têm maior presença de colágeno I do que tumores nos estádios II e III (FENHALLS et al., 1999), o que justificaria a baixa expressão, já que ambos os carcinomas estão no estágio II. No entanto, este achado é inconsistente com o fato de que uma alta presença de colágeno I aumenta significativamente a iniciação, progressão

e metástase do tumor (MORO et al., 2005; PROVENZANO et al., 2008; ARAUJO et al., 2009). Esse mesmo conceito é observado para altas expressões no colágeno III e fibronectina, estando associado ao aumento do grau tumoral (IOACHIM et al., 1997; SCHUMMER et al., 2010; LEE et al., 2012), e nossos resultados também demonstraram esse padrão proteico em ambos carcinomas.

5.5. CONCLUSÃO

Conclui-se que devido ao arranjo das fibras de colágeno, e alta expressão de colágeno III, fibronectina, VEGF e PCNA, o carcinoma sólido apresenta maior grau de malignidade. Esta malignidade está relacionada tanto às suas características histológicas quanto aos componentes de sua matriz extracelular.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 3nd ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- AMITKUMAR, K. **et al.** Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in breast carcinoma and its association with Ki67 and tumor grade in mastectomy specimens. **Annals of Pathology and Laboratory Medicine**, v.4, p.1, 2017.
- ARAUJO, V. **et al.** Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and Beta-catenin in carcinomaexpleomorphic adenoma. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v.17, p.312-8, 2009.
- BAKRANIA, A.K.; VARIYA, B.C.; PATEL, S.S. Role of b-interferon inducer (DEAE-Dextran) in tumorigenesis by VEGF and NOTCH1 inhibition along with apoptosis induction. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, p. 930, 2017.
- BATEMAN, J.F.; BOOT-HANDFORD, R.P.; LAMANDÉ, S.R. Genetic diseases of connective tissues: Cellular and extracellular effects of ECM mutations. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.173–183, 2009.

BECKMANN, M.W. **et al.** Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. **Journal of Molecular Medicine**, v.75, p.429–439, 1997.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S.; VASSEUR, S.; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. **Oncogenesis**, v.5, p.e189, 2016.

CASSALI, G.D. **et al.** Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumours. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v.4, p.153- 180, 2011.

CURRAN, S.; MURRAY, G.L. Matrix metalloproteinases: Molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **European Journal of Cancer**, v.36, p.1621-1630, 2000.

DALECK, C.R.; NARDI, A.B. **Oncologia em cães e gatos**. 2nd ed. São Paulo: Roca, 2008.

DEVARAJAN, E. **et al.** Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: A possible mechanism for chemoresistance. **Oncogene**, v.21, p.8843-8851, 2002.

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, p.1673–1681, 2004.

EVAN, G.I.; VOUSDEN, K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v.411, p.342–348, 2001.

FENHALLS, G. **et al.** Breast tumour cell-induced down-regulation of type I collagen mRNA in fibroblasts. **British Journal of Cancer**, v.81, p.1142-9, 1999.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: Application of the human classification. **Virchows Arch**, v.453, p.123–132, 2008.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: Atualização baseada na nova classificação da organização mundial da saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.48, p.463-474, 2012.

GOLDSCHMIDT, M. **et al.** Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, p.117-131, 2011.

HANA, W. **et al.** Oriented collagen fibers direct tumor cell intravasation. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v.113, p.11208-11213, 2016.

IOACHIM, E. **et al.** “Immunohistochemical expression of cathepsin D in correlation with extracellular matrix component, steroid receptor status and proliferative indices in breast cancer,” **Virchows Arch**, v.431, p.311-316, 1997.

JIANG, W.G. **et al.** Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. **Seminars in Cancer Biology**, v.35, p. S244-S275, 2015.

KARAYANNOPOULOU, M. **et al.** Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p.246–252, 2005.

KIEBISH, M.A. **et al.** Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: Lipidomic evidence supporting the warburg theory of cancer. **Journal of Lipid Research**, v. 49, p.2545-56, 2008.

LEE, S. **et al.** Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. **Cancer Research**, v.72, p.4574–4586, 2012.

LIOTTA, L.A. Tumor invasion and metastases - Role of extracellular matrix. **Cancer Research**, v.46, p.1-7, 1986.

LOPES NETO, B.E.; GIRÃO, V.C.C.; PINHEIRO, D.C.S.N. Envolvimento da matriz extracelular no tumor mamário canino. **Ciência Animal**, v.27, p.48-67, 2017.

MATOS, I. **et al.** p63, Cytokeratin 5, and P-cadherin: Three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Archiv**, v.447, p.688–94, 2005.

MIRSHAFIEY, A. **et al.** Chemopreventive effect of M2000, a new anti-inflammatory agent. **Medical Science Monitor**, v.10, p.PI105–PI109, 2004.

MISDORP, W. **et al.** Canine malignant mammary tumors: II adenocarcinomas, solid carcinomas and spindle cell carcinomas. **Veterinary Pathology**, v.9, p.447-470, 1972.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, p.439–443, 2001.

MORRIS, B.A. **et al.** Collagen matrix density drives the metabolic shift in breast cancer cells. **EBioMedicine**, v.13, p.146–156, 2016.

MORO, L. **et al.** Down-regulation of BRCA2 expression by collagen type I promotes prostate cancer cell proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p.22482–91, 2005.

OHTANI, O. Three-dimensional organization of the connective fibers of the human pancreas: A scanning electron microscopic study of NaOH treated tissues. **Archivum Histologicum Japonicum**, v.50, p.557–566, 1987.

OLIVEIRA, M.F. **et al.** Chorioallantoic and yolk sac placentation in *Trichomys laurentinus* [Echimyidae] and the evolution of histricognath rodents. **Molecular and Developmental Evolution**, v.318, p.13–24, 2012.

PACHNICKI, J.P.A. **et al.** Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrogênio e progesterona no câncer de mama, pré e pós-quimioterapia neoadjuvante. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, p.86–92, 2012.

PROVENZANO, P.P. **et al.** Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, v.6, p.11, 2008.

PROVENZANO, P.P. **et al.** Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, v.4, p.38, 2006.

RASOTTO, R. **et al.** Prognostic significance of canine mammary tumor histologic subtypes: An observational cohort study of 229 cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, p.571–578, 2017.

RESTUCCI, B.; BORZACCHIELLO, G.; MAIOLINO, P. Expression of vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in canine mammary tumors. **Journal of Comparative Pathology**, v.130, p.99–104, 2004.

REZAIE, A. **et al.** Grading in canine mammary gland carcinoma. **Journal of Biological Sciences**, v.9, p.333–338, 2009.

RIVERA, P.; VON EULER, H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. **Vetinary Pathology**, v.48, p.132- 146, 2011.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**. 2nd ed. Philadelphia: Sanders, 2001.

SCHUMMER, M. **et al.** Comparison of breast cancer to healthy control tissue discovers novel markers with potential for prognosis and early detection. **PLoS One**, v.5, p. e9122, 2010.

SHINDE, A. **et al.** Autocrine fibronectin inhibits breast cancer metastasis. **Molecular Cancer Research**, v.16 p.1579-1541, 2018.

SOTTILE, J.; HOCKING, D.C. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p. 3546-3559, 2002.

TAVASOLY, A. **et al.** Classification and grading of canine malignant mammary tumors. **Veterinary Research Forum**, v.4, p.25-230, 2013.

TOLOSA, E.M.C. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2nd ed. São Paulo: Manole, 2003.

VAKKALA, M.; PÄÄKKÖ, P.; SOINI, Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. **British Journal of Cancer**, v.81, p.592–599,1999.

VERRAX, J. **et al.** Delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) by gene electrotransfer as a new antiangiogenic cancer therapy. **Molecular Pharmaceutics**, v.8, p.701–708, 2011.

WILLIPINSKI-STAPELFELDT, B. **et al.** Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**, v.11, p.8006-14, 2005.

WILSON, D.F. **et al.** Oral Cancer: role of basement membrane in invasion. **Australian Dental Journal**, v. 44, p. 93-7, 1999.

World Health Organization, 2018. www.who.int/cancer/events/breast_cancer_month/en/

YANG, J. **et al.** Prognostic value and clinicopathological significance of serum- and tissue-based cytokeratin 18 express level in breast Cancer: a meta-analysis. **Bioscience Reports**, v.38, p.BSR20171145, 2018.

YIN, S. **et al.** Prognostic value and clinicopathological significance of proliferating cell nuclear antigen expression in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v.10, p.319–327, 2017.

ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M.D. **Bases da patologia em veterinária**. 5th ed. São Paulo: Elsevier, 2013.

ZUCCARI, D.A.P.C. **et al.** A imunoexpressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. **Revista Portuguesa Ciência Veterinaria**, v.99, p.173-178, 2004.

ZHANG, S. **et al.** Mesenchymal phenotype of circulating tumor cells is sssociated with distant metastasis in breast cancer patients. **Cancer Management and Research**, v.9, p.691–700, 2017.

6. Artigo IV - Efeito do Tratamento de Doxorrubicina em Associação com Células-Tronco de Membrana Amniótica Sobre Células de Carcinoma Inflamatório Mamário Canino (IPC-366).

BMC Veterinary Research - submetido em 24/10/2018

Jéssica Borghesi¹, Sara Caceres², Lara Carolina Mario¹, Angela Alonso-Diez³, Adriana Raquel A. Anunciação¹, Laura Peña³, Maria J. Illera², Gema Silvan², Maria Angélica Miglino¹, Ana Claudia O. Carreira^{1,4}, Phelipe O. Favaron¹, Juan Carlos Illera².

¹Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil;

² Departamento de Fisiologia Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Complutense de Madri (UCM), Madri, Espanha

³ Departamento de Medicina Animal, Cirurgia e Patologia, Unidade de Oncologia Mamária (UOM), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Complutense de Madri (UCM), Madri, Espanha

⁴NUCEL (Centro de Terapia Celular e Molecular) Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO: Tumores nas glândulas mamárias representam a neoplasia mais comum em cadelas, assim como observado em humanos. Esta alta incidência resulta em parte da estimulação de hormônios sexuais nessas glândulas. Entre os tumores mamários, o carcinoma inflamatório é o mais agressivo, apresentando um mau prognóstico ao tratamento cirúrgico e quimioterápico. Devido a isso, estudos de tratamento com uso de células-tronco surgiram, uma vez que, as mesmas possuem propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com doxorrubicina (DOXO) em associação com células-tronco de membrana amniótica canina (AMC) sobre células de carcinoma inflamatório mamário canino (IPC-366). Para isso, quatro grupos experimentais foram analisados: grupo controle sem tratamento; grupo I com DOXO, grupo II com AMC e grupo III associação de DOXO com AMC. Os resultados mostraram que as células tratadas com 10 µg/mL de DOXO resultaram em uma redução de 71,64% do crescimento celular após 72 horas de tratamento. Uma redução na expressão de VEGF e PCNA-3 foi observada em todos os tratamentos. Os níveis intracelulares de receptores de estrogênio também foram significativamente aumentados no grupo III em relação a controle (4,67% vs 27,1%). Em relação aos níveis de hormônios esteróides, observou-se aumento significativo nos níveis de estradiol (E2) e sulfato de estrona (S04E1) nos grupos I e III. Concluímos que a associação de DOXO com AMC (grupo III) em células triplamente negativas IPC-366 apresentou melhores resultados em relação à redução do crescimento celular e na expressão de proteínas relacionadas à proliferação e angiogênese.

Palavras-Chave: câncer de mama; cão; cocultura; membrana amniótica; terapia.

6.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de células tumorais ocorre a partir de uma série de mutações sequenciais resultantes da instabilidade genética. Um estudo mais recente mostrou que a influência de fatores ambientais em células saudáveis pode acarretar estas mutações, resultando na formação tumoral (SCHAEFER; SERRANO, 2016).

Tumores nas glândulas mamárias caninas representam a neoplasia mais comum em cadelas (DUTRA et al., 2004). Este tipo de tumores em cadelas é muito semelhante quanto ao comportamento biológico, resposta a agentes citotóxicos e características histológicas comparadas aos tumores apresentados em humanos, mas sua taxa de incidência é três vezes maior que em mulheres (MOE, 2001). Esta alta incidência resulta, em parte, da estimulação de hormônios sexuais na glândula mamária de cadelas e mulheres que são expostos a eles ao longo de sua vida reprodutiva (FARHAT et al., 2011). Essa hipótese é apoiada pela expressão de receptores de estrogênio e progesterona; sendo possível que eles atuem como fatores promotores, estimulando a proliferação celular, mas não agindo como fatores iniciadores. No entanto, quando atuando juntos em combinação com outros fatores como fatores ambientais e epigenéticos em diferentes fases da formação do tumor, é possível que eles desempenhem um papel determinante na formação tumoral (MISAWA; INOUE, 2015).

Entre os tumores de mama, podemos destacar o carcinoma inflamatório mamário, como a neoplasia mais agressiva encontrada, acometendo tanto mulheres quanto cadelas (PEÑA et al., 2003). O câncer de mama inflamatório é uma patologia caracterizada pela rápida progressão. Embora este tipo de câncer seja menos frequente, representando apenas 2% a 4% do total de câncer de mama nos EUA, ele apresenta a maior taxa de mortalidade (WOLBANK et al., 2017). Atualmente, o carcinoma mamário triplo negativo continua a ser um grande desafio para a medicina humana e veterinária em termos de diagnóstico e tratamento (YAO et al., 2017). Caceres et al. (2015) estabeleceram a primeira linhagem de células de carcinoma inflamatório mamário canino (IPC-366) com um fenótipo epitelial e expressão tripla negativa para ER (receptor de estrogênio), PR (receptor de progesterona) e HER-2 (fator de crescimento epidérmico humano Receptor 2). Esta nova linha celular estabelecida também mantém as mesmas características *in vivo* e exibe propriedades de mimetismo vasculogênico *in vitro* e *in vivo*.

Normalmente, o tratamento do câncer mamário na espécie canina baseia-se na cirurgia para remoção do tumor e da cadeia mamária, seguido da quimioterapia adjuvante,

que é realizada após tratamento cirúrgico, para erradicar possíveis metástases, aumentando a sobrevida do animal (RUTTEMAN et al., 2001). No entanto, este tratamento é contraindicado em casos de carcinoma inflamatório, devido ao extenso envolvimento cutâneo e sua associação com coagulopatias (SUSANECK et al., 1983). No entanto, a quimioterapia convencional sozinha não causa efeitos efetivos. Autores têm estudado tratamentos alternativos para o carcinoma inflamatório mamário canino, como a associação do fármaco doxorubicina ao peroxicam (MARCONATO et al., 2009). Muitos outros agentes estão sendo usados em outros tipos de tumores, como a associação de células-tronco, que podem reduzir o tamanho do tumor ou prolongar a sobrevivência do organismo (MOMIN et al., 2010).

Recentemente, tem havido um interesse crescente em estudos com células-tronco, especificamente células-tronco fetais. Essas células têm grande capacidade de proliferação e expansão *in vitro* (FERNANDES et al., 2012). Além disso, devido ao fato de serem encontrados na interface materna fetal, são imunologicamente toleráveis, tornando-se uma fonte interessante para uso em transplantes e em terapia celular. Vários estudos de transplante e enxerto foram realizados com membrana amniótica humana a termo e seus resultados demonstraram que essas células não causam resposta imune (WOLBANK et al., 2007). Essa imunogenicidade pode ser explicada pelas propriedades imunomoduladoras que as membranas fetais possuem, por estarem envolvidas na manutenção e tolerância materno-fetal (PAROLINI, 2008). Diversos mecanismos auxiliam nessas características, tais como: a função da membrana amniótica em secretar proteínas anti-inflamatórias e sua atividade pró-apoptótica que promove a apoptose de leucócitos (ZHOU et al., 2003).

Devido a esses fatos, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de células-tronco da membrana amniótica em associação com tratamento quimioterápico no carcinoma inflamatório mamário canino.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1. Cultura Celular da Linhagem de Células de Carcinoma Inflamatório Mamário Canino (IPC-366)

A linhagem celular IPC-366 foi obtida do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Complutense de Madrid, sendo anteriormente caracterizada por Caceres et al. (2015). As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's*

Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich, D6421) suplementado com 5% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, 12103C), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, P0781) e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, G7513). As células foram mantidas em garrafas 25 cm² em estufa controlada a 37 °C, com umidade relativa de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

6.2.2. Cultura Celular das Células-Tronco da Membrana Amniótica Canina (AMC)

As células-tronco da membrana amniótica canina (AMC) foram obtidas em campanha de castração através da coleta do útero gestante durante o procedimento de histerectomia. O procedimento foi aprovado pela comissão de ética em uso animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ-USP (9077100215). O isolamento celular foi realizado de acordo com Uranio et al. (2011) e Park et al. (2012). Estas células foram previamente caracterizadas por Borghesi et al. (submetido). As células AMC foram mantidas no mesmo meio e condições de cultura das células IPC-366, como descrito acima.

6.2.3. Ensaio de Interação Através de Cocultura Celular

Para o ensaio de interação por cocultura, as células foram plaqueadas em placas de seis poços transwell (CORNING Inc, NY, EUA). As células AMC (3×10^4 células) foram plaqueadas no compartimento superior de transwell, enquanto as células IPC-366 (5×10^4 células) foram plaqueadas no compartimento inferior. Os tratamentos foram realizados por 24, 48 e 72 horas e divididos em três grupos experimentais: Grupo I (GI): IPC-366 tratado com doxorrubicina, Grupo II (GII): IPC-366 tratado com AMC; e grupo III (GIII): IPC-366 tratado com a associação de doxorrubicina e AMC. Um grupo de controle de células IPC-366 sem tratamento foi utilizado em todos os experimentos.

6.2.4. Determinação da Dosagem de Doxorrubicina

Para determinação da concentração ideal de doxorrubicina (Sigma-Aldrich, D1515) a ser utilizada. A linhagem celular IPC-366 foi exposta a diferentes concentrações, sendo estas: 1, 2, 5 e 10 µg/mL. Para análise foi realizado o teste de viabilidade celular através da técnica de ensaio de avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico (MTT).

6.2.5. Ensaio de Metabolismo Celular (MTT)

Foram plaqueadas 1×10^3 células de IPC-366 por poço em placa de 96 poços e após sua aderência foram adicionados diferentes concentrações de doxorrubicina e após 24, 48 e 72 horas foram realizadas as análises. Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, e em seguida adicionado 10 μ l de solução de MTT (Sigma-Aldrich, M5655) e incubado por 2 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período foi retirado a solução de MTT e adicionado 100 μ l de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, M5655) e incubado por mais 1 hora em temperatura ambiente protegido da luz. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (MQuant– Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

6.2.6. Análise Morfológica

Para a análise morfológica, as células foram observadas em um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100) todos os dias de tratamento, a fim de verificar as alterações morfológicas.

6.2.7. Curva de Crescimento

Células de IPC-366 (3×10^4 células) foram cultivadas em placas de 6 poços (Sigma-Aldrich, CLS3335) e tratadas durante 72 horas. A cada 24 horas, 3 poços de cada tratamento e 3 poços de controle foram contados com azul de tripan para avaliar o crescimento celular.

6.2.8. Ciclo Celular

Para análise do ciclo celular, as células foram tratadas e posteriormente lavadas com tampão fosfato salino (PBS), fixadas em etanol a 70% a 4 °C. Em seguida, as células foram tratadas com 40 mg/mL de iodeto de propídio (PI), 100 μ g/ mL (RNase A, Sigma-Aldrich) e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSariaII Cell Sorter (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e analisado pelo software Modfit 2.9.

6.2.9. Citometria de Fluxo

As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBSA na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas com anticorpos primários (diluição de 1:100) por 30 minutos a 4°C. Após este período as células foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:500) por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas e células marcadas apenas com o anticorpo secundário inespecífico. Para cada amostra, foram contados 10000 eventos. Os anticorpos primários utilizados foram: Anti-VEGF (ab1316, Abcam, Cambridge, UK), Anti-PCNA-3 (sc-46, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Anti-progesterona receptor (ab-2764, Abcam, Cambridge, UK), anti-estrogeno receptor (ab2746, Abcam, Cambridge, UK), anti-TGF- β (sc-146, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e anti-IL-10 (MCA2111B, AbD Serotec, Califórnia, USA). Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse (ab150115, Abcam, Cambridge, UK) e anti-rabbit (ab150079, Abcam, Cambridge, UK).

6.2.10. Análise dos Hormônios Esteroides

O meio de cultura de células controle e de células tratadas foram coletadas e congeladas a -20 °C para análise hormonal. Os níveis de hormônios foram medidos através do ensaio imunoenzimático (EIA), previamente validado por Illera et al. (2016). Os hormônios esteróides testados foram: Sulfato de estrona (SO4E1: ab R522-2), estradiol (E2: C6E91), androstenediona (A4: ab C9111), testosterona (T: R156), di-hidrotestosterona (DHT: C1D4), desidroepiandrosterona (DHEA: C9411), progesterona (P4: C914) e pregnenolona (P5: C1P53). Todos os anticorpos foram desenvolvidos no Departamento de Fisiologia Animal (UCM, Espanha). Todas as concentrações hormonais foram expressas em ng/mL.

6.2.11 Análise Estatística

Os resultados obtidos da análise de MTT e da curva de crescimento foram submetidos ao teste ANOVA one-way, já os resultados de análise hormonal foram submetidos ao ANOVA two-way. O pós-teste de Bonferroni foi utilizado em ambas

análises. Para as análises, o software utilizado foi o Graph Pad Prism versão 5.0. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Efeito da Doxorrubicina no Metabolismo Celular de Células IPC-366

Para estabelecimento da dosagem quimioterápica ideal em células IPC-366, foram testadas concentrações distintas de doxorrubicina (1, 2, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) pelo método colorimétrico de MTT. Em todos os tempos (24, 48 e 72 horas), observamos que houve redução no metabolismo das células em todas as concentrações em relação ao controle. Porém apenas a partir de 48 horas observamos uma redução maior na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em relação as de 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$. Sendo assim, a dose 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentou a maior eficácia no tratamento do IPC-366, com redução de 22,76% após 24 horas, 50,76% às 48 horas e 71,64% às 72 horas. Portanto, a dosagem de 10 $\mu\text{g/mL}$ foi escolhida para ser usada durante o tratamento (Figura 1 A-C).

6.3.2. Análise da Curva de Crescimento

O crescimento celular foi observado através da curva de crescimento. O grupo I e o III, apresentaram similaridade em seu crescimento, onde as células tratadas apresentaram um crescimento linear até 48 horas, após esse período, ocorreu uma queda em seu crescimento. Já o grupo II apresentou um crescimento contínuo, contudo significativamente menor que as células controle. Em todos os grupos é evidente a diferença do crescimento das células controle (IPC-366 sem tratamento) em relação aos grupos tratados, sendo que estes demonstraram uma diminuição significativa do crescimento (Figura 1D).

Figura 1: Análise de MTT e curva de crescimento.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A], [B] e [C] células IPC-366 tratadas com doxorubicina em distintas concentrações (1, 2, 5, 10 µg/mL) por 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Em [D] curva de crescimento de células controle e células tratadas com doxorubicina (10 µg/mL) e células AMC em 24, 48 e 72 horas. Asteriscos (* $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). Letras diferentes (a, b, c) apresentam diferenças estatísticas.

6.3.3. Análise Morfológica

Alterações morfológicas nas células durante os diferentes tratamentos também foram observadas. Analisando as células controles durante o período de 72 horas foi observado a permanência do formato epitelial e uma confluência com aspecto de células entrelaçadas as quais formavam um aglomerado celular (Figura 2A-C). Nos grupos tratados observamos resultados distintos, no grupo I com 24 horas o mesmo formato epitelial foi verificado, porém a partir de 48 horas as células perdem o seu formato original passando a ter um formato arredondado e irregular (Figura 2D-F). No grupo II, durante todo tratamento as células mantiveram sua morfologia epitelial com as mesmas características das células controle (Figura 2G-I). E no grupo III a partir de 48 horas apenas algumas células começaram a perder sua morfologia original, diferindo do grupo I que

praticamente todas as células perderam seu formato original apresentando um formato irregular (Figura 2J-L).

Figura 2: Análise morfológica de células IPC-366 durante 72 horas de tratamento

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-C] Células controle IPC-366, [D-F] IPC-366 tratado com DOXO, [G-I] IPC-366 tratado com AMC e [J-L] IPC-366 tratado com AMC e DOXO.

6.3.4. Análise do Ciclo Celular

Pelas análises do ciclo celular foi possível determinar qual fase do ciclo as células estavam em cada tratamento. No grupo I, a maioria das células encontrava-se na fase G0 / G1 (interfase celular) (44,42%, 77,07% e 43,54% em 24, 48 e 72 horas, respectivamente). No grupo II, as células apresentaram picos distintos em cada tempo de tratamento, sendo que com 24 horas o maior número de células expressas estavam em G2 / M (56,14%), 48 horas na fase S (55,14%) e 72 horas na fase G0 / G1 (75,60%). No grupo III, às 24 horas as células estavam em G2 / M (50,45%), às 48 horas a maior população estava em G0 / G1 (48,88%) e às 72 horas na fase S (58,02%) (Figura 3).

Figura 3: Análise do ciclo celular de células IPC-366.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-C] Análise do ciclo celular às 24, 48 e 72 horas, mostrando a fase de interfase (G0 \ G1), a fase de replicação do DNA (S) e de divisão celular (G2M).

6.3.5. Citometria de Fluxo

A expressão das proteínas apresentadas nas células IPC-366 após os tratamentos foi determinada por análise de citometria de fluxo. Quanto à expressão do receptor de progesterona, observou-se que as células controle apresentaram baixa expressão (3,78%). No entanto, os grupos I e II, após os tratamentos, obtiveram uma redução ainda maior (0,026% e 0,63%, respectivamente), em contraste com o grupo III, que apesar de ter apresentado baixa marcação, apresentou um aumento de expressão (5,21%) em relação aos demais grupos (Figura 4A). Quanto aos níveis de receptor de estrógeno o controle apresentou também baixa expressão (4,67%), no entanto, no grupo I houve uma queda ainda maior nos níveis de expressão (0,026%). Por outro lado, no grupo II houve um aumento de 2,4 vezes em seus valores (11,26%) quando comparado ao controle; e no grupo III as células voltaram a expressar a proteína estrogênica (27,1%) (Figura 4B).

Em relação à expressão do VEGF, as células controle apresentaram altos níveis de expressão (79,9%) e nos grupos tratados, observou-se redução de 22,8%, 30,4% e 66,1% nos grupos I, II e III, respectivamente (Figura 4C). Avaliou-se também a expressão de PCNA. E os resultados revelaram alta expressão no controle (86,2%) e no grupo II (65,4%). No entanto, no grupo I (28,5%) e no grupo III (45,6%) houve uma queda significativa nesses valores (Figura 4D).

A interleucina IL-10 foi expressa no grupo controle (30,6%), assim como no grupo II (28,1%), diferindo do grupo I (2,45%) e grupo III (5,26%), os quais não foram expressos (Figura 4E). E por fim, o TGF- β também foi analisado e os resultados mostraram baixa expressão nas células controle (11,5%), porém no grupo I (0,14%) e no grupo II (1,38%) houve uma grande redução em relação ao controle, enquanto no grupo III a expressão de TGF- β foi maior que no controle (25,5%) (Figura 4F).

Figura 4: Análise de citometria de fluxo em células IPC-366 controle e tratadas.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Células controle e tratadas com DOXO, AMC e DOXO + AMC. [A] RE (receptor de progesterona), [B] RE (receptor de estrogênio), [C] VEGF, [D] PCNA-3, [E] IL-10, [F] TGF- β .

6.3.6. Concentrações de Hormônio Esteróide no Meio de Cultura

Os níveis hormonais dos esteróides apresentados no meio de cultura das células tratadas com IPC-366 foram analisados por ELISA. No grupo I foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de P4, A4, E2 e SO4E1, e uma redução nos níveis de DHEA e DHT ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. No grupo II, um aumento significativo ($p < 0,05$) foi observado apenas nos níveis de P4 e DHT, mostrando que o tratamento não foi suficiente para causar alterações nas concentrações de hormônios esteroides. Finalmente, o tratamento no grupo III reduziu significativamente ($p < 0,05$) os andrógenos DHEA e DHT, enquanto houve um aumento nos níveis de estrogênio ($p < 0,05$) E2 e SO4E1 (Figura 5).

Figura 5: Níveis de hormônios esteróides em meio de cultura de células IPC-366 controle e tratadas.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: Os gráficos mostraram concentrações hormonais de pregnenolona (P5) [A], progesterona (P4) [B], desidroepiandrosterona (DHEA) [C], androstenediona (A4) [D], di-hidrotestosterona (DHT) [E], testosterona (T) [F], estradiol (E2) [G] e sulfato de estrona (SO4E1) [H] durante o período de tratamento (24, 48 e 72 horas). Grupos tratados (DOXO, AMC e DOXO + AMC) foram comparados ao grupo controle durante o período de tratamento. Asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.4. DISCUSSÃO

Um dos agentes quimioterápicos mais eficazes usados no tratamento de tumores hematológicos e sólidos é a doxorubicina (BUTANY et al., 2009). No entanto, muitos tipos de tumores exibem resistência a múltiplos fármacos, o que pode levar a uma diminuição da sua eficácia após uma resposta inicial favorável (GIANNI et al., 2008). Em nossos resultados *in vitro*, verificamos que a dosagem ideal de doxorubicina foi de 10 µg/mL para tratar as células IPC-366, resultando em uma redução na proliferação e crescimento celular de até 71,64% em 72 horas de tratamento. Esta mesma dosagem foi utilizada para tratar a linhagem celular de adenocarcinoma triplo negativo MDA-MB-231, onde a doxorubicina causou uma redução de 50% do crescimento em 24 horas (LI et al., 2015), demonstrando menor resistência ao fármaco quando comparado a linhagem IPC-366 que em 24 horas demonstrou uma redução de crescimento de apenas 22,76%. No entanto, as células IPC-366 já foram descritas como uma linhagem de células tumorais agressivas (CACERES et al., 2015), porém a doxorubicina conseguiu causar uma redução no crescimento celular, demonstrando que esta droga pode fornecer uma atividade antitumoral efetiva no câncer mamário canino. Contudo, atualmente a resistência à quimioterapia representa o maior obstáculo para o sucesso no tratamento de câncer de mama em humanos e cães (SMITH; MURPHY, 1994).

As células-controle IPC-366 apresentaram uma morfologia epitelial, conforme descrito por Caceres et al., (2015). Neste trabalho, durante o tratamento com células AMC, foi possível verificar que, apesar de todos os fatores liberados pela AMC, estes não influenciaram em sua morfologia celular, no entanto, após o tratamento com doxorubicina as mesmas apresentaram alterações celulares como ruptura da membrana celular e formato arredondado, indicando apoptose celular. Isso está de acordo com outros estudos que testaram o efeito dessa droga em células tumorais (ANIOGO et al., 2017).

As células tumorais, incluindo as células de câncer de mama são caracterizadas por exibir um crescimento e proliferação celular descontrolado. Uma maneira de julgar a eficácia dos tratamentos anticancerígenos é pela sua capacidade de prender o ciclo celular (SHERR, 1996; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A doxorubicina é um agente não específico do ciclo celular, atuando nas fases de divisão e repouso. No entanto, sua principal ação citotóxica é observada durante a fase S do ciclo celular, alterando a estrutura do DNA e produzindo radicais livres que ajudam no combater do câncer (RODASKI; DE NARDI, 2004). Estes efeitos foram encontrados neste estudo para os grupos I e III, onde a

maioria das células foi encontrada na fase S após 72 horas de tratamento com doxorrubicina. No entanto, no grupo II, o tratamento com AMC, verificou-se que as células estavam na fase G0 / G1. Isso pode ser explicado pela secreção de citocinas liberadas pelas células-tronco mesenquimais. Essas citocinas são capazes de induzir a parada do ciclo celular das células tumorais (COUSIN et al., 2009).

Os hormônios esteróides sexuais, especialmente os estrogênios, desempenham um papel fundamental na carcinogênese mamária em mamíferos, inclusive em cadelas (SILVA et al., 2004). Um importante preditor para o câncer de mama é a avaliação do perfil de expressão do receptor de estrogênio (ER) e progesterona (PR), que permite ao médico prever as respostas do câncer de mama ao tratamento (THORPE, 1982). No tumor, se for observada maior expressão de ER e RP, há maior probabilidade de resposta à terapia hormonal (HAWKINS, 2000). Portanto, a taxa de resposta ao tratamento de pacientes classificados como ER (-) e PR (-) é de apenas 10%. Esta taxa aumenta para 40% (REINER et al., 1990) em pacientes com ER (+) e PR (-). Células IPC-366 foram caracterizadas como negativas para expressão de receptores de estrogênio e progesterona, e após tratamento com doxorrubicina associada a célula AMC (grupo III), foi evidenciada uma reversão em sua expressão. As células retornaram um fenótipo positivo para o receptor de estrogênio, expressando o percentual de 27,1%, e permaneceram negativas para o receptor de progesterona com um percentual de 5,21%.

Além dos receptores hormonais, outras proteínas também foram avaliadas, como o VEGF envolvido na angiogênese tumoral. Os resultados mostraram uma menor taxa de expressão no tratamento com doxorrubicina demonstrando um efeito benéfico do quimioterápico. A inibição do VEGF reduz a anormalidade dos vasos e aumenta a permeabilidade do tumor à quimioterapia (FERRARA et al., 2003). Essa redução também foi observada para a proteína PCNA que foi altamente expressa na linhagem IPC-366 e, após todos os tratamentos, foi observada uma redução significativa em sua expressão. Essa redução na expressão de PCNA com o tratamento com doxorrubicina pode ser explicada devido ao seu papel na inibição da topoisomerase II, que induz a quebra de DNA, inibindo sua replicação (LEHMANN et al., 2003). Como as células derivadas da membrana amniótica têm um efeito antiproliferativo, ela pode interromper o ciclo celular na fase G0 / G1 por fatores desconhecidos (MAGATTI et al., 2002). Esses fatores produzidos pelas células-tronco amnióticas podem regular a expressão das proteínas das células cancerosas associadas ao ciclo celular, como a quinase dependente de ciclina (CDK2, CDK4, CDK6) e ciclinas (ciclina D2, ciclina E1, ciclina H).

Nossas análises mostraram que a menor expressão da interleucina IL-10 ocorreu quando a doxorrubicina foi usada, associada ou não às células AMC. Este fármaco contribuiu para a redução da resposta inflamatória e imunossupressora, promovendo um microambiente favorável para a resposta imune aos tumores. Isso está de acordo com Nugroho et al. (2012), que verificaram os efeitos imunossupressores da doxorrubicina.

Outra molécula envolvida nas vias de sinalização do câncer de mama é o TGF- β , que pode induzir a transição epitelial-mesenquimal e sua expressão pode ser influenciada negativamente pelos níveis de estrogênio. O ER-alfa inibe a sinalização de TGF-beta, diminuindo os níveis de proteína Smad. Altos níveis de estrogênio podem suprimir os níveis de TGF- β (PAPAGEORGIS, 2015). Isso também pode ser observado em nossos tratamentos, uma vez que os grupos I e II, que não apresentaram expressão estrogênica, também estavam ausentes para o TGF- β , diferentemente do grupo III que apresentou expressão para estrogênio e, conseqüentemente, para TGF- β .

Por outro lado, a atividade normal das células normais depende da perfeita integração entre suas vias metabólicas, que é controlada principalmente pelos hormônios esteroides (GUYTON, 1991). Os hormônios esteroides, entre outros fatores, induzem ou promovem a carcinogênese, estimulando a proliferação celular (HENDERSON; FEIGELSON 2000). Sabe-se que existem duas vias esteroidogênicas para a produção de hormônios esteroides, ambos apresentando o colesterol como uma molécula precursora (MIZRACHI; AUCHUS, 2009). Primeiro, o colesterol é convertido em P5, que é o primeiro hormônio da cascata esteroide e precursor dos hormônios DHEA e P4. Em uma das vias esteroidogênicas, os androgênios são formados a partir da conversão de P5 em DHEA, que vai liderar a formação de A4. Na outra via, P5 é inicialmente convertido em P4, que é conseqüentemente convertido em A4, um precursor de andrógeno. A primeira via é conhecida como via $\Delta 5$, enquanto a segunda via é chamada de via $\Delta 4$ (NGUYEN et al., 2012). A4 pode ser convertido em T, que é o hormônio precursor do DHT. No entanto, o A4 pode ser diretamente convertido em estrógenos pela conversão de A4 em estrona (E1) e subsequentemente em SO4E1. Finalmente, a testosterona também pode dar origem a estrógenos, resultando na produção de E2 (SECKY et al., 2013). Portanto, as células neoplásicas podem sofrer um desequilíbrio nas vias esteroidogênicas, por isso, a produção de hormônios é um dos alvos das terapias para o tratamento de várias neoplasias, principalmente o câncer de mama (AHMAD; KUMAR, 2011; AFRICANDER; STORBECK, 2018). Por esse motivo, nosso estudo avaliou a interferência dos tratamentos realizados nos níveis dos principais hormônios esteroides.

No grupo I, tratado com doxorrubicina, observamos que não houve interferência na via de estrogênio, uma vez que os níveis de E2 e SO4E1 foram aumentados no final do período de tratamento. No entanto, o DHEA estava em níveis baixos, indicando inibição da via $\Delta 5$, que é a via esteroidogênica preferida no carcinoma inflamatório de mama (MCNAMARA; SASANO, 2015). Outros estudos *in vitro* também mediram esses hormônios após o tratamento com inibidores de andrógenos, com resultados semelhantes ao nosso tratamento com doxorrubicina, escolhendo a via $\Delta 5$ (CACERES et al., 2018). Relacionando os resultados obtidos na análise hormonal, onde verifica-se a presença de produção de estrógeno, com os dados obtidos na análise de citometria de fluxo no qual verificou-se a ausência de receptores de estrógenos, podemos inferir que apesar de os hormônios conseguirem entrar nas células através de sua membrana (Cooper, 2000) estes podem estar acumulados no meio, podendo não ter efeitos funcionais nas células IPC-366. Os receptores de hormônios esteróides dependem de fatores intracelulares de transcrição que medeiam suas ações biológicas (SCARPIN et al., 2009). Além disso, os receptores são responsáveis pela transdução de sinalização hormonal para os genes-alvo, interagindo com sequências de DNA específicas e várias proteínas reguladoras, incluindo ativadores ou co-repressores (AHMAD; KUMAR, 2011). Portanto, a ausência da expressão do receptor causa a continuidade da malignidade nesse tipo de carcinoma.

No grupo II, o tratamento com AMC não interferiu em todas as etapas do metabolismo esteroidogênico das células IPC-366. Os resultados sugerem que a redução de P5 pode ter ocorrido devido à sua conversão total em progesterona após as primeiras 48 horas de tratamento. Resultados semelhantes foram observados com os níveis de T, que foram reduzidos drasticamente após 24 horas de tratamento sendo totalmente convertidos em DHT. Esse acúmulo de DHT pode sugerir que o tratamento com AMC pode ser eficaz na redução da proliferação de células tumorais de câncer de mama, já que este é o androgênio mais potente para essa função, isto também pode ser visto na linhagem celular de câncer de mama MCF-7 (MACEDO et al., 2006).

Finalmente, no grupo III (associação de doxorrubicina e AMC), o efeito do tratamento não alterou significativamente os níveis dos hormônios da via $\Delta 4$, provavelmente devido à baixa disponibilidade de P5 como substrato. Os níveis de DHEA sofreram uma redução significativa, como ocorreu no grupo I, o que nos leva a supor que o AMC exerceu um efeito modulador na produção hormonal da via $\Delta 4$ (Figura 6). Além disso, com este tratamento observamos um aumento nos níveis hormonais de estrógenos (E2 e SO4E1) assim como em seus receptores, os quais voltaram a serem expressos

quando analisados por citometria. Portanto a associação de doxorubicina com células AMC demonstraram ser um tratamento efetivo para a reversão da malignidade tumoral, uma vez que, estes voltam a ser responsivos ao estrogênio possibilitando o desenvolvimento de novas terapias com tratamento hormonal.

Figura 6: Esquema dos principais efeitos do tratamento com doxorubicina (DOXO) e células da membrana amniótica canina (AMC) em células IPC-366.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: A proliferação das células IPC-366 poderia ser estimulada pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que era inibido pelo tratamento da associação DOXO + AMC. A proliferação celular ainda é influenciada por outros fatores, como o TGF-β. Podemos observar que a associação DOXO + AMC promoveu um aumento dessa proteína, o que levou a uma diminuição na proliferação celular. Devido à alta taxa de proliferação celular da IPC-366, as chances de formação de novos vasos (angiogênese) encontravam-se aumentadas e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi um estimulador desse processo. Quando as células foram tratadas com a combinação de DOXO + AMC, foi possível observar uma diminuição nos níveis de VEGF, o que pode contribuir para uma menor chance de metástase. A resposta imune é essencial para a supressão do crescimento do tumor; entretanto, a interleucina-10 (IL-10), além de ser uma citocina anti-inflamatória, também está relacionada ao "mascaramento" dessa resposta, dificultando o processo de reconhecimento. Observamos que, após o tratamento com DOXO + AMC, houve diminuição

dos níveis de IL-10, o que pode permitir que as células tumorais sejam reconhecidas pelos componentes do sistema imune além de diminuir o processo inflamatório. A progressão tumoral está relacionada ainda com o controle do ciclo celular, que é dividido em três fases: G0 / G1, S e G2 / M. Após o tratamento com DOXO + AMC houve um aumento de células na fase G1 / G0 e diminuição na fase G2 / M, devido a uma redução na duplicação celular. Além disso, os hormônios esteróides, são capazes de estimular a progressão do câncer de mama e, portanto, são indispensáveis para a avaliação das etapas das vias estereodigênicas. Após o tratamento com a associação de DOXO+AMC, houve redução nos níveis de P5, DHEA e DHT, enquanto houve aumento de E2 e SO4E1. Observamos também que houve um aumento na expressão do receptor de estrogênio (ER), que pode ser usado como um alvo terapêutico. Setas e tratamentos (DOXO + AMC) em vermelho indicam a inibição enquanto o verde indica o estímulo. P4: progesterona; A4: androstenediona; E1: estrone

6.5. CONCLUSÃO

A associação de células de doxorrubicina e AMC demonstrou, pela primeira vez, ser um tratamento alternativo e efetivo para tumores triplo-negativos, pois encontramos um aumento nos receptores de estrogênio, obtendo células que podem ser suscetíveis à terapia antiestrogênica, permitindo a aplicação da terapia hormonal nestes tumores.

REFERÊNCIAS

AFRICANDER, D.; STORBECK, K.H. Steroid metabolism in breast cancer: Where are we and what are we missing? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.5, p.86-97, 2018.

AHMAD, N.; KUMAR, R. Steroid hormone receptors in cancer development: a target for cancer therapeutics. **Cancer Letters**, v.300, p.1-9, 2011.

ANIOGO, E.C.; GEORGE, B.P.A.; ABRAHAMSE, H. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v.17, p.693-702, 2017.

BORGHESI, J. **et al.** (submetido). Canine amniotic membrane mesenchymal stromal/stem cells: Isolation, characterization and differentiation.

BUTANY, J.; AHN, E.; LUK, A. Drug-related cardiac pathology. **Journal of clinical pathology**, v. 62, p.1074–1084, 2009.

CACERES, S. **et al.** In vitro and in vivo effect of flutamide on steroid hormone secretion in canine and human inflammatory breast cancer cell lines. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.16, p.148-158, 2018.

CACERES, S. **et al.** Establishment and characterization of a new cell line of canine inflammatory mammary cancer: IPC-366. **PLoS ONE**, v.10, p. e0122277, 2015.

COOPER, R.L. **et al.** Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. **Toxicological Sciences**, v.53, p.297-307, 2000.

COUSIN, B. **et al.** Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both *in vitro* and *in vivo*. *Plos One*, v.4, p.e6278, 2009.

DUTRA, A.P. **et al.** C-ErbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors: comparative aspects with human breast tumor. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p. 1673-1681, 2004.

FARHAT, G.N. **et al.** Sex hormone levels and risks of estrogen receptor-negative and estrogen receptor-positive breast cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v.103, p. 562–570, 2011.

FERNANDES, R.A. **et al.** Placental tissues as sources of stem cells—Review. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 2, p.166-173, 2012.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v.9, p.669-76, 2003.

GIANNI, L. **et al.** Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. **Journal of Clinical Oncology**, v.26, p.3777–3784, 2008.

GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1991.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.4, p. 646-647, 2011.

HAWKINS, R.A. How best to express oestrogen receptor activity. **British Journal of Cancer**, v.36, p. S21-3, 2000.

HENDERSON, B.E.; FEIGELSON, H.S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.21, p. 427-433, 2000.

HICKEY, T.E. **et al.** Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? **Molecular Endocrinology**, v. 26, p.1252-67, 2012.

ILLERA, J.C. **et al.** Steroid hormone secretion in inflammatory breast cancer cell lines. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v.24, p.137-145, 2015.

LEHMANN, M. **et al.** Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.539, p.167-175, 2003.

LI, P. **et al.** Acoustic separation of circulating tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.112, p.4970-4975, 2015.

MAGATTI, M. **et al.** Amniotic membrane derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, p. 2208-2218, 2002.

MARCONATO, L. **et al.** Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, p.967-972, 2009.

MACEDO, L.F. **et al.** Role of androgens on MCF-7 breast cancer cell growth and on the inhibitory effect of letrozole. **Cancer Research**, v. 66, p.7775-7782, 2006.

MCNAMARA, K.M.; SASANO, H. The intracrinology of breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v,145; p.172-178, 2015.

MISAWA, A.; INOUE, S. Estrogen-related receptors in breast cancer and prostate cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v.6; 1-7, 2015.

MIZRACHI, D., AUCHUS, R.J. Androgens, estrogens and hydroxysteroid dehydrogenases. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.301, p.37-42, 2009.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.57, p.439–443, 2001.

MOMIN, E.N. **et al.** Mesenchymal stem cells: new approaches for the treatment of neurological diseases. **Current Stem Cell Research and Therapy**, v.5, p.326-344, 2010.

NGUYEN, P.T. **et al.** Multilevel regulation of steroid synthesis and metabolism in the bovine placenta. **Molecular Reproduction and Development**, v.79, p.239-254, 2012;

NUGROHO, A.E. **et al.** Synergistic effects of ethyl acetate fraction of *Ficus septica* Burm. f. and doxorubicin chemotherapy on T47D human breast cancer cell line. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v.10, p.1162-1170, 2012.

PAPAGEORGIS, P. TGF β Signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. **Journal of Oncology**, v.2015, p.587193, 2015.

PARK, S.B.; SEO, M.S.; KIM, H.S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **Plos ONE**, v.9, n.e44693, 2012.

PAROLINI, O. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. **Stem Cells**, v.26, p.182-192, 2008.

PEÑA, L. **et al.** Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.84, p.211–6, 2003.

REINER, A. **et al.** Immunohistochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. **Cancer Research**, v.50, p.7057-61, 1990.

RODASKI, S.; DE NARDI, R.B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Editora Maio, 2004.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland In: MACEWEN, G.E.; WITHROW, S.J. **Small animal clinical oncology**. Philadelphia: Saunders Company, 2001.

SCARPIN, K.M. **et al.** Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. **Nuclear Receptor Signaling**, v.7, p. e009, 2009.

SCHAEFER, M.H.; SERRANO, L. Cell type-specific properties and environment shape tissue specificity of cancer genes. **Scientific Reports**, v.6, p.1-14, 2016.

SECKY, L. **et al.** The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors. **Journal Drug Delivery**, v.2013, p.1-13, 2013.

SHERR, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, v. 274, p.1672-1677, 1996.

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, p.624-633, 2004.

SMITH, D.M.; MURPHY, W.M. Histologic changes in prostate carcinomas treated with leuprolide (luteinizing hormone–releasing hormone effect). Distinction from poor tumor differentiation. **Cancer**, v.73, p.1472-1477, 1994.

SUSANECK, S.J. **et al.** Inflammatory mammary carcinoma in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.9, p.971-976, 1983.

THORPE, S.M. Estrogen and progesterone receptor determinations in breast cancer. Technology, biology and clinical significance. **Acta Oncologica**, v. 27, p.1-19, 1988.

URANIO, M.F. **et al.** Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adneza: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matriz. **Molecular Reproduction and Development**, v.78, p.361-373, 2011.

WOLBANK, S. **et al.** Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Tissue Engineering**, v.13, p.1173–1183, 2007.

YAO, H. **et al.** Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? **Oncotarget**, v.8, p.1913-1924, 2017.

ZHOU, S.; CHEN, J.; FENG, J. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. **Chinese Medical Journal**, v.116, p.788-790, 2003.

7. Artigo V – Interação entre Células-Tronco de Membrana Amniótica Canina e Carcinoma Sólido Mamário Canino *in vitro*

Jéssica Borghesi¹, Lara Carolina Mario¹, Ana Carolina Silveira Rabelo¹, Franceliusa Dellys de Oliveira¹, Adriana Raquel de Almeida da Anunciação¹, Rafael Gonçalves Hayashi¹, Maria Angélica Miglino¹, Phelipe Oliveira Favaron¹, Ana Claudia Oliveira Carreira^{1,2}

¹Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil;

²NUCEL (Centro de Terapia Celular e Molecular) Faculdade de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO: O câncer é considerado a principal causa de morte entre os animais de estimações, sendo que os tumores em glândulas mamária representam o tumor maligno mais comum entre as cadelas. Em relação aos tratamentos, muitas vezes é necessária a utilização da quimioterapia para erradicar metástases, no entanto, a maioria dos tumores caninos é apenas moderadamente sensível à quimioterapia. Nesse contexto, o atual cenário favorece ensaios terapêuticos pré-clínicos e pesquisas voltadas para novos tratamentos anti-câncer. Nesse sentido, o uso de células-tronco amnióticas tem se destacado neste campo. Assim, objetivou avaliar a eficácia do tratamento de células-tronco amniótica canina (AMC) e doxorrubicina (DOXO) estando estes ou não associados sobre células de carcinoma sólido mamário canino (TCM) *in vitro*. Para isso, quatro grupos experimentais foram analisados: grupo controle sem tratamento; grupo I com DOXO, grupo II com AMC e grupo III associação de DOXO com AMC. Nossos resultados demonstraram que tanto o grupo DOXO, quanto o grupo associação DOXO com AMC obtiveram uma redução na atividade de seu metabolismo e de seu crescimento celular. Contudo o grupo AMC demonstrou um aumento na atividade do metabolismo celular das células tumorais, porém com uma redução em seu crescimento celular comparada ao controle. Verificamos também, que as células controle se encontravam predominantemente na fase S do ciclo celular. E após todos os tratamentos as células se encontraram na fase de repouso G0/G1. Em relação a análise de proliferação verificamos que as células controle apresentam capacidade proliferativa em 24, 48 e 72 horas, contudo após as 48 horas de tratamentos as mesmas deixam de proliferar. Sendo assim, concluímos que o tratamento com células AMC sendo esta ou não associada à doxorrubicina possui a capacidade de prender as células no ciclo celular na fase de repouso fazendo com que as mesmas apresentem redução em seu crescimento e proliferação celular.

Palavras-chave: células-tronco; ciclo celular, membrana amniótica; tumor mamário.

7.1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado a principal causa de morte entre os animais de estimação (WITHROW, 2001), sendo que os tumores em glândulas mamária representam o tumor maligno mais comum entre as cadelas (MOULTON, 1978; DAVIDSON, 2003; DUTRA et al., 2004; EGENVALL et al., 2005), com uma incidência anual estimada de 182 casos a cada 100.000 cadelas (MERLO et al., 2008).

Pesquisas tem crescido nos últimos anos sobre tumores mamários caninos, não só por causa do aumento da taxa de diagnósticos em medicina veterinária (LANA et al., 2007), mas também porque esses tumores representam modelos valiosos para o câncer de mama humano (SORENMO et al., 2009; UVA et al., 2009). Isso se deve à sua incidência, semelhança na idade relativa de início, fatores de riscos e padrão metastático (VAIL; MACEWEN, 2000; RIVERA; VON EULER, 2011).

Em relação aos tratamentos, a cirurgia é eleita como o principal método para o câncer de mama na espécie canina, contudo muitas vezes é necessária a utilização da quimioterapia para erradicar metástases ou recidiva tumoral (RUTTEMAN et al., 2001). No entanto, a maioria dos tumores caninos é apenas moderadamente sensível à quimioterapia (SHARMA et al., 2018) e, devido a isso, a quimioterapia adjuvante não melhora significativamente a sobrevida de cães com câncer de mama invasivo avançado (TRAN et al., 2016). Além desses tratamentos convencionais existe ainda a hormonioterapia, mas que está associada a efeitos adversos em cães (TAVARES et al., 2010). Desta forma, a maioria dos cães acaba se beneficiando apenas da mastectomia, muitas vezes associado a ovariectomia (KRISTIANSEN et al., 2015). Nesse contexto, o atual cenário favorece ensaios terapêuticos pré-clínicos e pesquisas voltadas para novos tratamentos anti-câncer (NGUYEN et al., 2018).

Sendo assim, nos últimos anos, novas abordagens terapêuticas tem sido estudadas e utilizadas para o tratamento de diferentes tipos tumorais. Nesse sentido, o uso de células-tronco amnióticas tem se destacado neste campo. Estudo realizado por Kang et al. (2012), demonstrou que células de membrana amniótica são capazes de inibir o crescimento tumoral quando transplantadas em camundongos com câncer de mama. Além disso, Mamede et al. (2014), mostraram que proteínas extraídas de membrana amniótica humana foram capazes de inibir em até 50% a atividade metabólica de diferentes tipos de câncer, dentre eles câncer de próstata, mama e pâncreas.

Este efeito das células-tronco amnióticas em relação aos tumores, pode estar relacionado a vários mecanismos que auxiliam estas características, entre eles podemos citar a função da membrana amniótica de secretar proteínas anti-inflamatórias e sua atividade pró-apoptótica que promove a apoptose de leucócitos (HORI et al., 2006; LI et al., 2006). Além disso, possuem a capacidade de suprimir a inflamação local (EL-JAWHARI et al., 2014) e promover o reparo e regeneração do tecido lesado (LINERO; CHAPARRO, 2014), sem imunogenicidade e toxicidade ao hospedeiro (KAMDJE et al., 2014).

Com isso, devido a todos os fatores mencionados acima se objetivou avaliar a eficácia do tratamento de células-tronco amniótica canina e doxorrubicina estando estes ou não associados sobre células de carcinoma sólido mamário canino *in vitro*.

7.2. MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1. Animais Utilizados

Foram coletados fragmentos de carcinoma sólido mamário oriundos de cinco cadelas submetidas a cirurgia de mastectomia em campanha de castração realizadas na cidade de Embu das Artes, São Paulo, Brasil. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (número do protocolo: 9077100215).

Após a remoção dos fragmentos dos tumores, estes foram lavados cinco vezes com PBS contendo 5% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, P0781) e acondicionados em meio de cultivo para transporte suplementado com 5% de penicilina-estreptomicina, 15% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, 12103C) e 80% de meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich, D6421), onde posteriormente foram transportados para o laboratório de cultivo celular.

7.2.2. Cultura de Células de Carcinoma Sólido Mamário Canino (TCM)

Amostras de carcinoma sólido mamário canino foram digeridas em collagenase I (0,1%) (Life Technologies, Cat.17100-017, Carlsbad, USA) a 37°C. Após a digestão

enzimática, o material foi centrifugado a 1200 rpm e o sobrenadante ressuspendido em 1 mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM/F12) (Sigma-Aldrich, D6421) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, 12103C), 1% penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, P0781) e 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich, G7513). Em seguida, foram cultivadas em placas (Corning, Cat.3296, NY, USA) que foram mantidas em estufa de cultura a 37 °C e 5% de CO₂.

7.2.3. Cultura de Células-Tronco da Membrana Amniótica Canina (AMC)

As células-tronco de membrana amniótica canina (AMC) foram obtidas em campanha de castração através da coleta do útero gestante durante o procedimento de histerectomia. O procedimento foi aprovado pela comissão de ética em uso animal (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ-USP (9077100215). O isolamento celular foi realizado de acordo com Uranio et al. (2011) e Park et al. (2012). Estas células foram previamente caracterizadas por Borghesi et al. (submetido). As células AMC foram mantidas no mesmo meio e condições de cultura das células TCM, como descrito acima.

7.2.4. Ensaio de Interação Através de Cocultura Celular

Para o ensaio de interação por cocultura, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços transwell (CORNING Inc, NY, EUA). As células AMC (5×10^3 células) foram plaqueadas no compartimento superior de placa *transwell*, enquanto as células IPC-366 (2×10^4 células) foram plaqueadas no compartimento inferior. Os tratamentos foram realizados por 24 e 48 horas e divididos em três grupos experimentais: Grupo I (GI): TCM tratado com doxorrubicina (DOXO), Grupo II (GII): TCM tratado com AMC; e grupo III (GIII): TCM tratado com a associação de DOXO e AMC. Um grupo controle de células TCM sem tratamento foi utilizado em todos os experimentos.

7.2.5. Determinação da Dosagem de Doxorrubicina

Para determinação da concentração ideal de doxorrubicina (Sigma-Aldrich, D1515) a ser utilizada. As células TCM foram exposta a diferentes concentrações, sendo estas: 1,

2, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Para análise foi realizado o teste de viabilidade celular através da técnica de ensaio de avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico (MTT).

7.2.6. Ensaio de Metabolismo Celular (MTT)

Foram plaqueadas 2×10^3 células de TCM por poço em placa de 24 poços e após sua aderência foram adicionados diferentes concentrações de doxorubicina e após 24 e 48 horas foram realizadas as análises. Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, e em seguida adicionado 10 μL de solução de MTT (M5655, Sigma-Aldrich) e incubado por 2 horas a 37 °C protegida da luz. Após esse período foi retirado a solução de MTT e adicionado 100 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, M5655) e incubado por mais 1 hora em temperatura ambiente protegido da luz. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (MQuant– Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 490 nm.

7.2.7. Análise Morfológica

Para a análise morfológica, as células foram observadas em um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100) todos os dias de tratamento, a fim de verificar as alterações morfológicas.

7.2.8. Curva de Crescimento

Células de TCM (2×10^4 células) foram cultivadas em placas de 24 poços (CLS3335, Sigma-Aldrich) e tratadas durante 48 horas. A cada 24 horas, 3 poços de cada tratamento e 3 poços de controle foram contados com azul de tripan para avaliar o crescimento celular.

7.2.9. Ciclo Celular

Para análise do ciclo celular, as células TCM foram tratadas e posteriormente lavadas com tampão fosfato salino (PBS), fixadas em etanol a 70% a 4 °C. Em seguida, as células foram tratadas com 40 mg/mL de iodeto de propídio (PI), 100 $\mu\text{g/mL}$ (RNase A, Sigma-Aldrich) e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Aria II Cell

Sorter (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e analisado pelo software Modfit 2.9.

7.2.10. Proliferação Celular

As células de TCM foram incubadas por 20 minutos com 1 μ L do corante CellTrace (Kit CellTrace Blue Cell Proliferation®). Em seguida, foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio de cultura. Após 24 horas as células foram coletadas no tempo zero (T_0), nas demais células foram adicionados os tratamentos e uma nova incubação foi realizada. Posterior às células controle e tratadas foram coletadas em 24 (T_{24}), 48 (T_{48}) e 72 horas (T_{72}) respectivamente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). Os dados foram analisados no programa FCS Express (6.0).

7.2.11. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA one-way, e o pós-teste de Bonferroni foi utilizado nas análises. Para as análises, o software utilizado foi o Graph Pad Prism versão 5.0. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando $p < 0,05$.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Ensaio do Metabolismo Celular de Células TCM

Inicialmente realizamos o ensaio do metabolismo celular nas células TCM para verificar qual a melhor dosagem de doxorubicina a ser utilizada nestas células. Assim, verificamos que com 24 horas houve uma redução no metabolismo das células TCM em todas as dosagens de doxorubicina (1, 2, 5 e 10 μ g/mL), em relação ao controle. Dentre essas doses, foi observada uma redução significativa com a dose de 10 μ g/mL, quando comparada às demais. Já com 48 horas, novamente houve uma redução do metabolismo celular em todas as doses testadas em relação ao controle. Entretanto, podemos observar que a dose de 10 μ g/mL promoveu uma diminuição significativa em relação à dose de 5 μ g/mL.

Desta forma, a dose de 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentou os melhores resultados referente a redução do metabolismo celular, apresentando queda de 44% e 65% em 24 e 48 horas, respectivamente. Sendo assim, 10 $\mu\text{g/mL}$ foi a dose selecionada para realização dos demais experimentos para o Grupo I e Grupo III (Figura 1A-C).

No tratamento do grupo II com células AMC ocorreu o inverso que no grupo anterior, sendo que tanto para o tempo de 24 como para o de 48 horas houve um aumento no metabolismo das células tratadas de 44% e 37% respectivamente (Figura 1D e E). Contudo no tratamento do grupo III de associação de DOXO com células AMC observamos uma redução no metabolismo celular de 18% e 28% nos tempos de 24 e 48 horas respectivamente (Figura 1F e G).

Figura 1: Análise do metabolismo celular (MTT) de células TCM.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-C] células TCM tratadas com doxorubicina em distintas concentrações (1, 2,5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 24 e 48. [D-E] células TCM tratadas com células AMC em 24 e 48 respectivamente. [F-G] células TCM tratadas com doxorubicina (10 $\mu\text{g/mL}$) e células AMC em 24 e 48 horas respectivamente. Asteriscos (* $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

7.3.2. Análise Morfológica

Durante os experimentos com seus respectivos tratamentos podemos observar mudanças morfológicas distintas em cada grupo de células. Nas células TCM controle, podemos observar que apresentavam uma morfologia muito similar as de células fibroblastoides, com citoplasma alongado e núcleo centralizado. Contudo é possível visualizar melhor estas características com 24 horas, pois com 48 horas estas células já apresentavam uma alta confluência dificultando a visualização, uma vez que as mesmas se encontram unidas umas as outras (Figura 2A e B).

No grupo I (TCM+DOXO) é visível uma mudança em sua morfologia, uma vez que as células passaram a ter formatos irregulares, perdendo a morfologia fibroblastoide. Também é notável a diminuição na quantidade de células presentes, principalmente, após 48 horas de tratamento em relação ao controle (Figura 2C e D). Já o grupo II (TCM+AMC) não apresenta, em nenhum dos tempos, mudança em sua morfologia, sendo notável somente uma maior quantidade de células presentes em 24 horas em relação às de 48 horas (Figura 2E e F).

Por fim o grupo III (TCM+DOXO+AMC) demonstrou que com 24 horas de tratamento estas células apresentaram morfologia fibroblastoide semelhante ao controle e uma quantidade relativamente maior de células, quando comparadas as de 48 horas. Além disso, com 48 horas podemos visualizar uma mudança na morfologia das células com formatos irregulares, assim como no grupo I (Figura 2G e H).

Figura 2: Análise morfológica de células TCM controle e tratadas.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-B] células controle, [C-D] TCM+DOXO, [E-F] TCM+AMC, [G-H] TCM+DOXO+AMC. Todas as análises morfológicas foram realizadas em 24 e 48 horas. Aumento 5x.

7.3.3. Curva de Crescimento

Para verificação do crescimento das células durante os tratamentos realizamos a curva de crescimento, a fim de verificar as diferenças existentes entre o tratamento e o controle. No grupo I, verificamos que as células tratadas com DOXO não apresentaram crescimento celular entre 24 e 48 horas, mantendo o mesmo número de células neste período. Contudo, é evidente a diferença entre as células controle, que tiveram um alto crescimento (Figura 2A). No grupo II, verificamos que as células tratadas com AMC obtiveram um crescimento, no entanto, menor em relação às células controle (Figura 2B). E no grupo III, verificamos que o tratamento de DOXO associada à AMC, fez com que as células apresentassem uma redução em seu crescimento celular significativamente menor que as células controle (Figura 2C).

7.3.4. Ciclo Celular

Podemos observar que as células TCM mantiveram um padrão em relação as fases do ciclo celular que se encontravam tanto em 24 quanto em 48 horas. Sendo assim, em ambos os tempos avaliados verificamos que as células TCM controle se encontravam predominantemente na fase S com 94,4% e 59,8% de expressão, respectivamente, em 24 e 48 horas. Em relação aos tratamentos, podemos observar que todos os grupos se encontravam predominantemente na fase G0/G1 apresentando no grupo I percentagem de (70,2% e 64,4%), no grupo II (56,34% e 72,99%) e no grupo III (57,56% e 63,07%) em 24 e 48 horas, respectivamente. A segunda fase predominante foi a S, porém com valores relativamente menores que na fase G0/G1, sendo que o grupo I apresentou expressão de (17,9% e 29,17%), o grupo II (30,05% e 23,68%) e o grupo III (34% e 36,93%) em 24 e 48 horas, respectivamente.

Figura 3: Análise de curva de crescimento e ciclo celular de células TCM.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A-C] curva de crescimento de células TCM, [A] TCM+DOXO, [B] TCM+AMC, [C] TCM+AMC+DOXO em 24 e 48 horas. Observar que letras diferentes na mesma linha (a e b) apresentam diferenças estatísticas dentro do mesmo grupo de análise (controle ou tratamento. E (*) apresenta diferença estatística no mesmo tempo entre controle e o tratamento. [D-E] ciclo celular de células TCM controle e tratadas em 24 e 48 horas respectivamente. Notar que (*) e (#) significa diferença estatística da fase G0/G1 e fase S respectivamente dos tratamentos em relação ao controle.

7.3.5. Proliferação Celular

A análise de proliferação celular foi realizada afim de verificar a capacidade de proliferação das células TCM tratadas em relação as células controle sem tratamento por um periodo de até 72 horas. Os resultados demonstraram que as células controle proliferaram de 24 a 72 horas, contudo observamos que os grupos I e II não apresentaram proliferação em nenhum dos tempos avaliados. Porém, as células do grupo III apresentaram uma capacidade de proliferação apenas em 72 horas, quando comparada às de 24 horas ($p < 0,05$) (Figura 4A e B).

Figura 4: Análise de proliferação celular.

Fonte: Borghesi (2019).

Legenda: [A] desenho representativo da análise de proliferação celular em células TCM controle e tratadas, no tempo 0 horas (T0), 24 horas, 48 horas, e 72 horas. [B] gráfico demonstrando a % da mediana de intensidade de fluorescência nos tratamentos por 72 horas. Notar que letras diferentes (a e b) significativa diferença estatística dentro do mesmo grupo, e (*) significa diferença estatística do controle em relação aos tratamentos nos mesmos tempos.

7.4. DISCUSSÃO

A quimioterapia é o principal método de tratamento em humanos e, recentemente, na oncologia veterinária. A melhor eficácia da quimioterapia está no controle da disseminação da doença, maior sobrevida e melhor qualidade de vida dos pacientes, (TODOROVA et al., 2005). Contudo seu efeito pode variar de acordo com cada tipo de tumor mamário. Em nossos resultados observamos que as células TCM tratadas com doxorrubicina 10 µg/mL apresentaram uma redução de 44% e 65% em 24 e 48 horas respectivamente. Em relação ao tempo do quimioterápico utilizados podemos comparar nossos resultados aos estudos realizados com a linhagem de células tumorais de próstata humana DU-145 a qual demonstrou que o mínimo de tempo para produzir um efeito de 50% de morte é de 40 horas (AL-GHAMDI, 2008). Em relação a dosagem, a linhagem de mama MDA-MB-231 demonstrou que para matar 50% das células tumorais em 24 horas é necessário o uso de 25,72 µg/mL (KIBRIA et al., 2014). Esses resultados corroboram com nossos dados uma vez que a dose e o tempo para atingir a redução de 50% foi de 10 µg/mL de doxorrubicina em 48 horas nas células TCM. Essa redução pode também ser observada através da curva de crescimento onde ocorre a inibição do crescimento celular (OLIVEIRA et al., 2012; BAHUGUNA et al., 2017), estudos demonstram que a doxorrubicina tem a capacidade de aumentar a expressão de proteínas como p53 e caspase-3 que podem causar a apoptose justificando assim a diminuição do crescimento celular (YANG et al., 2013).

Apesar da doxorrubicina não ser um agente específico do ciclo celular, pois atua tanto em células em divisão quanto em células em repouso, a sua principal ação citotóxica é observada durante a fase S do ciclo (SUSANECK, 1983; RODASKI; NARDI, 2004). Isso também pode ser verificado em nossos resultados, uma vez que nossas células controle encontravam-se predominantemente na fase S do ciclo celular e nosso tratamento com doxorrubicina demonstrou que as células após o tratamento se encontravam predominantemente na fase G0/G1 (PHUC et al., 2011), ou seja, pararam de se dividir e se encontrava em repouso. Essa parada no ciclo celular também é visualizado através do teste de proliferação celular onde verificamos que as células deixaram de proliferar após o tratamento (PUSHPA et al., 2014).

Estudos pré-clínicos e clínicos recentes demonstraram que as terapias baseadas em células-tronco mesenquimais (CTM) contêm uma grande promessa para o tratamento de

doenças humanas, sendo especialmente promissores como agentes anticancerígenos. As CTM possuem propriedades migratórias inerentes ao tumor, que permite que elas sirvam como veículos para o fornecimento de terapia direcionada eficaz por meio de fármacos a tumores isolados e doenças metastáticas (SHAH, 2012). Baseado nisso, outro fator avaliado em nosso trabalho foi o efeito das células de membrana amniótica canina (AMC) sobre as células TCM. E o que podemos verificar foi que ocorreu um aumento na atividade de seu metabolismo celular após os tratamentos, assim como nos estudos com linhagem de células de mama humana MCF-7 e MDA-MB-231, o qual utilizou meio condicionado de CTM de cordão umbilical (LI et al., 2015). Um aumento também foi observado na linhagem de células leucêmicas K562 ao utilizar CTM de medula óssea por meio de cocultivo celular (LOW et al., 2018). Por outro lado, verificamos que apesar das células tratadas apresentarem um aumento em sua atividade metabólica, houve um menor crescimento celular e uma inibição da proliferação em relação às células controle. Esta diminuição no crescimento e na capacidade de proliferação está relacionada aos dados obtidos na análise do ciclo celular deste grupo, onde as células se encontravam predominantemente na fase de repouso G0/G1, após o tratamento. Ahn et al. (2015) analisando duas linhagens de melanoma humano A375SM e A375P tratadas com CTM de tecido adiposo também verificou que estas se encontravam na fase G0/G1 após os tratamentos, devido a isso os autores afirmam que existem razões para acreditar que as células-tronco reprimem o crescimento celular através da parada do ciclo na fase G0/G1.

As propriedades anticancerígenas da CTM também podem estar relacionadas ao fato destas possuírem mecanismos de reparo do DNA e defesa contra estresse oxidativo (SARETZK, et al. 2004), além de mecanismos de danos aos radicais livres os quais geram indução de vias de apoptose (BAXTER- HOLLAND; DASSI, 2017). Devido a esses fatores, quando avaliamos as células TCM tratadas com associação de doxorubicina e células AMC verificamos uma redução no metabolismo celular de 18% e 28% em 24 e 48 horas respectivamente. Porém, essa redução foi significativamente menor que no grupo DOXO, o que nos leva a inferir que são as células AMC que devem retardar a capacidade de redução no metabolismo das células TCM. Estes resultados se assemelham aos estudos de TU et al. (2016) em duas linhagens de células de osteosarcoma Saos-2 e U2-OS que quando expostas ao meio condicionado de CTM e tratadas com 10µg/mL de doxorubicina apresentaram uma sobrevida menor com taxa de apoptose significativamente menor quando tratadas apenas com doxorubicina. Os demais resultados também demonstraram que o crescimento celular e a capacidade de proliferação em 24 a 48 horas se encontravam

diminuídos em relação ao controle. Além disso, após o tratamento as células também se encontravam na fase G0/G1 do ciclo celular, o que justifica os demais resultados.

7.5. CONCLUSÃO

Concluimos, que o tratamento com células AMC sendo esta ou não associada à doxorrubicina possui a capacidade de manter as células no ciclo celular na fase de repouso fazendo com que as mesmas apresentem redução em seu crescimento e proliferação celular.

REFERÊNCIA

AHN, J.O. **et al.** Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells inhibit melanoma growth *in vitro* and *in vivo*. **Anticancer Research**, v.35, p. 159-168, 2015.

AL-GHAMDI, S.S. Time and dose dependent study of doxorubicin induced DU-145 cytotoxicity. **Drug Metabolism Letters**, v.2,2008.

BAHUGUNA, A. **et al.** MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v.12, p.115-118, 2017.

BAXTER-HOLLAND, M.; DASS, C.R. Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.70, p.320-372, 2018.

BORGHESI, J. **et al.** (submitted). Canine amniotic membrane mesenchymal stromal/stem cells: Isolation, characterization and differentiation

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, p.1673–1681, 2004.

DAVIDSON, E.B. **Treatment of mammary tumors in dogs and cats.** In proceedings: North Am Vet Conf. Orlando, USA, 2003.

EGENVALL, A. **et al.** Incidence of and survival after mammary tumours in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden. **Preventive Veterinary Medicine**, 69:109–127, 2005.

EL-JAWHAR, J. **et al.** Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis, **QJM: An International Journal of Medicine**, v.107, 505–514, 2014.

HORI, J. **et al.** Immunological characteristics of amniotic epithelium. **Cornea**, v.25, p.S53-58, 2006.

KAMDJE, A.H.N, **et al.** Mesenchymal stem cell therapy for breast cancer: Challenges remaining. **International Journal of Biomedical Science and Engineering**, v.2, p.20-24, 2014.

KANG, N.H. **et al.** Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in BALB/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. **International Journal of Oncology**, v.40, p. 2022-2028, 2012.

KIBRIA, G. **et al.** Comparative Study of the Sensitivities of Cancer Cells to Doxorubicin, and Relationships between the Effect of the Drug-Efflux Pump P-gp. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p.1926–1935, 2014.

KRISTIANSEN, V.M. **et al.** Tolerability and pharmacokinetic profile of a novel benzene-polycarboxylic acids complex with cis-diammineplatinum (II) dichloride in dogs with malignant mammary tumours. **Veterinary Comparative Oncology**, v.15, 2015.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. **Tumors of the mammary gland**. In: WITHROW, S.J.; VAIL D.M. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. Saunders Elsevier, 2007.

LI, T. **et al.** Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote proliferation and migration in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of the ERK pathway. **Oncology Reports**, v.34, p.1469-1477, 2015.

LI, W. **et al.** Amniotic membrane induces apoptosis of interferon-gamma activated macrophages *in vitro*. **Experimental Eye Research**, v.82, p. 282-292, 2006

LINERO, I.; CHAPARRO, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PLoS ONE**, v. 9, pe0119262, 2014.

LOW, J.H. **et al.** Modulatory Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Proliferation and Ultrastructural Changes in K562 Leukemic Cells. **Biomedical Journal Scientific & Technical Research**, v. 3, 2018.

MAMEDE, A.C. **et al.** Effect of Amniotic Membrane Proteins in Human Cancer Cell Lines: An Exploratory Study. **Journal Membrane Biology**, v.47, p.357–360, 2014.

MERLO, D. F. **et al.** Cancer incidence in pet dogs: Findings of the animal tumor registry of Genoa. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 976–984, 2008.

MOULTON, J.E. **Tumours in Domestic animals**. 2nd ed. University of California Press: Berkeley and Los Angeles: London; 1978.

NGUYEN, F **et al.** Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: natural history and prognostic factors. **Breast Cancer Research Treatement**, v.167, p.635–648, 2018.

OLIVEIRA, C.R. **et al.** Avaliação citotóxica em tres linhagens de celulas tumorais das fracoes obtidas da casca do caule de *Salacia crassifolia* (MART. ex. Schult.) G. Dom. (Celastraceae). **Revista Colombiana de Ciências Químico- Farmacéuticas**, v. 41,p. 133-142, 2012.

PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotente stem cells. **Plos one**, n. 7, v. 9, p. e44693, 2012.

PHUC P.V. **et al.** Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44 CD24 breast cancer cells. **Onco Targets and Therapy**, v.4, p. 71–78, 2011.

PUSHPA, R. S. **et al.** Enhancement of paclitaxel and doxorubicin cytotoxicity in breast cancer cell lines in combination with piperine treatment and analysis of expression of autophagy and apoptosis genes. **Journal of Medical and Scientific Research**, v.2, p.62-67, 2014.

RIVERA, P.; VON EULER, H. Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.48, p.132–146, 2011.

RODASKI, S.; DE NARDI, R.B. Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos , Curitiba: Editora Maio, p.307, 2004.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland In: MacEwen G.E; Whithrow, S.J. **Smal Animal Clinical Oncology**. 3ed, Saunders Company, 2001.

SARETZKI, G. **et al**. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. **Stem Cells**, v.22, p. 962–971, 2004.

SHAH. K. Mesenchymal Stem Cells engineered for Cancer Therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.739–748, 2012.

SHARMA, N. **et al**. Epidemiology and treatment of canine mammary tumours in Jammu region of India. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 7, p.59-62, 2008.

SORENMO, K.U. **et al**. Canine mammary gland tumours ; a histological continuum from benign to malignant ; clinical and histopathological evidence. **Veterinary Comparative Oncology**, v.7, p.162-172, 2009.

TAVARES, W.L. **et al**. Evaluation of adverse effects in tamoxifen exposed healthy female dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 67, 2010.

SUSANECK, S.J. Doxorubicin therapy in the dog. **JAVMA**, v.182, p.70-72, 1983

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

TRAN, C.M.; MOORE, A.S.; FRIMBERGER, A.E. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. **Veterinary Comparative Oncology**, v.14, p.252–262, 2016.

TU, B. **et al**. Mesenchymal stem cells promote osteosarcoma cell survival and drug resistance through activation of STAT3. **Oncotarget**, v.7, p. 48296– 48308, 2016.

URANIO, M. F. **et al**. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adneza: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matriz. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, p. 361-373, 2011.

UVA, P. **et al.** Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v.10, p.1-20, 2009.

VAIL, D.M.; MACEWEN, E.G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer Investigation**, v.18, p.781–792, 2000.

WITHROW, S.J. **Why worry about cancer in pets.** In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology** 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2001.

YANG, F. **et al.** Doxorubicin caused apoptosis of mesenchymal stem cells via p38, JNK and p53 pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.32, p.1072–1082, 2013.

8. CONCLUSÃO FINAL

Concluimos que células de membrana amniótica canina possuem características de células tronco, não possuindo potencial tumorigênico quando aplicadas *in vivo* tendo um alto potencial terapêutico. Somando-se a isso, quando as células foram utilizadas no tratamento de TCM e IPC-366, tanto os tratamentos utilizando apenas as células AMC, quanto em associação com doxorrubicina, causaram efeitos deletérios as células tumorais, como redução do metabolismo e crescimento celular, além da capacidade de manter as células tumorais estagnadas na fase de repouso do ciclo celular. Além disso, especificamente nas células IPC-366, o tratamento de associação causou um efeito na redução em proteínas relacionadas com a capacidade de angiogênese e proliferação celular e um aumento nos receptores de estrogênio. Desta forma, sendo as células IPC-366 uma linhagem triplo negativa, esse aumento nos receptores de estrógeno demonstram que estas células podem ser suscetíveis à terapia antiestrogênica, após tratamento prévio com AMC+DOXO, permitindo a aplicação da terapia hormonal nestes tumores.

REFERÊNCIA

ANDERSON, L. M. **et al.** Breast cancer-specific expression of the *Candida albicans* cytosine deaminase gene using a transcriptional targeting approach. **Cancer Gene Therapy**, v. 7, p. 845-852, 2000.

ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Endothelial progenitor cells for postnatal. Vasculogenesis. American journal of physiology. **Cell Physiology**, v.287, p. C572–C579, 2004.

DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. **Cancer-Principles and Practice of Oncology**. 5thed. Philadelphia: Lippincott Raven Pulishers, 1997.

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, p. 1673–1681, 2004.

FAITA, T. **et al.** Membrana amniótica: fonte alternativa de células-tronco mesenquimais em diversas espécies animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p.520-525, 2016.

FERNANDES, R. A. **et al.** Placental tissues as sources of stem cells—Review. **Open Journal of Animal Sciences**, v.2, p.166-173, 2012.

HAHN, K.A.; RICHARDSON, R.C. In: **Cancer Chemotherapy**. A veterinary Handbook. Williams and Wilkins, p.254, 1995.

KARAYANNOPOULOU, M. **et al.** Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: 93 application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v.133, p. 246-252, 2005.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental Dermatology**, v.12, p. 109-25., 2003.

KOBAYASHI, N.C.C.; NORONHA, S.M.R. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.61, p.86-93, 2015.

LANTINGA-VAN LEEUWEN, I. S. **et al.** Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75, p. 219–28, 2000.

LI, H. **et al.** Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.46, p.900-907, 2005.

MATOS, I. **et al.** p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 447, p. 688–94, 2005.

MARCUS, A.J.; WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.12, n.3, p.730-742, 2008.

MASSEE, M. **et al.** Dehydrated human amnion/chorion membrane regulates stem cell activity in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v.104, p.1495-1503, 2015.

MIKI, T. **et al.** Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v.23, p.1549–1559, 2005.

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cells**, v.24, p.2319–2345, 2006

MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: Meuten DJ. (ed.), **Tumors in domestic animals**. 4th ed. Ames, USA: Iowa State Press, p.575-606, 2002.

PARDAL, R.; CLARKE, M.F.; MORRISON, S.J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. **Natural Reviews Cancer**, v.3, p. 895–902, 2003.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J; MACEWEN, E.G. Tumors of the mammary gland In: MacEwen G.E; Whithrow, S.J. **Small Animal Clinical Oncology**. 3rded, Saunders Company, p.455-477, 2001.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, v.33, p. 573-596, 2003.

STIVAROU, T.; PATSAVOUDI, E. Extracellular molecules involved in cancer cell invasion. **Cancers**, v.7, p.238-265, 2015.

TROUNSON, A. The production and directed differentiation of human Embryonic stem cells. **Endocrine Reviews**, v.27, p.208–219, 2006.

WILSON, D.F. **et al.** Oral cancer: role of basement membrane in invasion. **Australian Dental Journal**, v. 44, p. 93-7, 1999.

WOLBANK, S. **et al.** Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Tissue Engineering**, v.13, p.1173–1183, 2007