SONIA ELISABETE ALVES DE LIMA WILL

**Efeito da terapia “*in vitro*” com célula tronco de medula óssea em tumores mamários
caninos**

São Paulo

2014

SONIA ELISABETE ALVES DE LIMA WILL

**Efeito da terapia “*in vitro*” com célula tronco de medula óssea em tumores mamários
caninos**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Dra. Rose Eli Grassi Rici

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3050
FMVZ

Will, Sonia Elisabete Alves de Lima
Efeito da terapia "*in vitro*" com célula tronco de medula óssea em tumores mamários caninos /
Sonia Elisabete Alves de Lima Will. -- 2014.
99 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dra. Rose Eli Grassi Rici.

1. Tumor de mama. 2. Terapia celular. 3. Angiogênese. 4. Metástase. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da terapia *"in vitro"* com células tronco de medula óssea em tumores mamários caninos", protocolado sob o nº 2455/2011, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade da Dra. Rose Eli Grassi Rici, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Effect of therapy *"in vitro"* with stem cell of bone marrow in mammary tumors canine", protocol number 2455/2011, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Rose Eli Grassi Rici, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 6 de novembro de 2014.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WILL, Sonia Elisabete Alves de Lima

Título: **Efeito da terapia “*in vitro*” com célula tronco de medula óssea em tumores mamários caninos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Doméstico 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 este trabalho ao meu marido Ricardo pela paciência, amor e dedicação, aos meus filhos Luís, e Fábio por me encherem de orgulho e sempre me ajudarem, a minha nora Ana Paula que me deu o melhor presente do mundo meu netinho João Lucas. Obrigada por tudo.... a toda minha família que entenderam e respeitaram minhas ausências para melhor execução de meu trabalho... Obrigada por tudo..."

Agradecimentos

À minha orientadora Dr^a. Rose Eli Grassi Rici, uma grande mulher, obrigada pelos conselhos, ensinamentos e amizade e por todo o auxílio para a realização deste trabalho e pela confiança em mim depositada. Muito obrigada pela paciência, compreensão, amizade e experiência.

Ào Prof^o. Dr^o Durvanei Augusto Maria, um grande homem e pesquisador, pela oportunidade, confiando-me a execução deste projeto, obrigada pelo precioso ensinamento. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna e ter feito parte de sua equipe.

À Prof^a. Dr^a Maria Angélica Miglino, pela oportunidade, confiando-me a execução deste projeto, obrigada.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, a todos que conheci e que fizeram parte deste momento muito importante de minha vida, sobretudo pela amizade.

Aos meus amigos de Pós-Graduação um obrigado a todos que conheci e que fizeram parte deste momento muito importante de minha vida, sobretudo pela amizade.

A todos os docentes do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP, pelo ensinamento e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa que me permitiu concluir com êxito esse nível de formação.

*“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na
Intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos
Inesquecíveis, coisas “inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

(Fernando Pessoa)

RESUMO

WILL, S. E. A. L. Efeito da terapia “*in vitro*” com célula tronco de medula óssea em tumores mamários caninos. [Effect of therapy "in vitro" with stem cell of bone marrow mammary tumors canine]. 2014. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O tumor mamário é a segunda neoplasia maligna mais incidente em cães, com uma elevada taxa de mortalidade. Em cães, constituem aproximadamente 52% de todos os tumores que afetam as fêmeas, possuindo uma elevada heterogeneidade biológica e histomorfológica, sendo que 50% são malignos. As neoplasias, independentemente de suas causas primárias, apresentam distúrbios no controle do ciclo celular, o que acaba gerando um aumento na proliferação celular, perda da diferenciação e formação de massas tumorais. Na gênese das neoplasias mamárias estão envolvidos fatores de natureza genética, ambiental e hormonal. O objetivo deste trabalho foi avaliar "in vitro" o efeito da terapia com célula-tronco da medula óssea canina de feto em tumores mamários canino. Após a avaliação histopatológica os tumores foram divididos em grupos de grau I (adenocarcinoma, sem metástase), grau II (carcinoma com metástase regionais) e grau III (carcinomas com metástases sistêmicas). As células dos tumores mamários caninos (TM) e as células - tronco de medula óssea de feto canina (CTMs) foram caracterizadas antes e após o tratamento utilizando marcadores de proliferação, angiogênese e da resposta inflamatória através da citometria de fluxo. A expressão de marcadores de proliferação celular Ki67 foi maior nas linhagens tumorais dos carcinomas grau III, o mesmo observado para os marcadores que regulam a angiogênese e migração celular como VEGF_{R1}, CD44, COX-2 e EGFR. Foi possível observar nas culturas celulares de TM a redução do potencial elétrico mitocondrial alterando permeabilidade da membrana ativando a caspase 3 e reduzindo a Bcl-2, sugerindo que a CTM apresenta efeitos antitumorais pela indução de apoptose e efeitos antiproliferativos da expressão de COX-2 e IL-6 inibindo a proliferação celular levando ao acúmulo das células na fase G0/G1. . A terapia celular com CTMs proporciona novas expectativas para o tratamento de diversas patologias que acometem diferentes espécies. . Desta forma, os resultados os resultados obtidos pela expressão das TM tratadas com CTM pode apresentar como uma nova perspectiva no tratamento de tumores em cadelas.

Palavras-chave: Tumor de mama. Terapia celular. Angiogênese. Metástase.

ABSTRACT

WILL, S. E. A. L. **Effect of therapy "in vitro" with stem cell of bone marrow mammary tumors canine**. [Efeito da terapia "*in vitro*" com célula tronco de medula óssea em tumores mamários caninos]. 2014. 99 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The breast tumor is the second most frequent malignancy in dogs, with a high mortality rate. In dogs, they constitute approximately 52% of all tumors affecting female, having a high biological and histomorphological heterogeneity, and 50% are malignant. Neoplasms, regardless of their root causes, have disturbances in cell cycle control, which ends up generating an increase in cell proliferation, differentiation loss and formation of tumor masses. In the genesis of mammary tumors are involved genetic, environmental and hormonal factors nature. The objective of this study was to evaluate "in vitro" the effect of therapy with stem cell-canine bone marrow fetus in canine mammary tumors. After histopathological evaluation tumors were divided into grade I groups (adenocarcinoma without metastasis), grade II (carcinoma with regional metastasis) and grade III (carcinomas with metastatic disease). The cells of canine mammary tumors (TM) and cells - bone marrow stem canine fetuses (MSCs) were characterized before and after treatment using proliferation markers, angiogenesis and inflammatory response by flow cytometry. The expression of cell proliferation markers Ki67 was higher in tumor cell lines of the carcinomas grade III, the same was observed for markers that regulate angiogenesis and cell migration as VEGFR1, CD44, COX-2 and EGFR. It was observed in TM cell cultures to reduce the electric potential changing mitochondrial membrane permeability by activating caspase 3 and reduces Bcl-2, suggesting that MSC has antitumor effects by inducing apoptosis and antiproliferative effects of COX-2 expression and IL-6 inhibiting cell proliferation leading to an accumulation of cells in G0 / G1 phase. Cell therapy MSCs provides new expectations for the treatment of various pathologies affecting different species. Thus, the results the results obtained by the expression of TM-treated MSC can present as a new approach in the treatment of tumors in dogs..

Keyword: Breast tumor. Cell therapy. Angiogenesis. Metastasis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	TERAPIA CELULAR.....	27
3	OBJETIVO	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODO	31
4.1	OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS DE TUMOR MAMA CANINO (TM).....	31
4.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA CANINA (CTM).....	31
4.3	CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CULTIVO CELULAR DO TUMOR DE MAMA	32
4.3.1	Imunocitoquímica	32
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO (TM) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	33
4.5	ANÁLISE DO SORO DOS ANIMAIS COM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.....	34
4.6	TERAPIA CELULAR “ <i>in vitro</i> ” COM CÉLULA TRONCO DE MEDULA ÓSSEA CANINA EM CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO.....	35
4.6.1	Análise morfológica das células tumor de mama canino tratadas	36
4.6.2	Sistema de Co-cultura	36
4.6.3	Análise das modificações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
4.6.4	Ensaio de Proliferação com CFSE-DA	37
4.6.5	Avaliação da expressão de marcador de proliferação celular Ki67 por citometria de fluxo	38
4.6.6	Análises das fases do ciclo celular	38
4.6.7	Avaliação da expressão da caspase 3 ativa e das proteínas Bax, Bcl-2, envolvidas da regulação da apoptose por citometria de fluxo	38
4.6.8	Avaliação da expressão de reguladores da via pro a anti inflamatória por citometria de fluxo	39
4.6.9	Avaliação da apoptose por citometria de fluxo (Anexina V/PI)	39
4.6.10	Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)	40
4.6.11	Análises estatística	40
5.	RESULTADOS	41
5.1	CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CULTIVO CELULAR DO TUMOR DE MAMA	41
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO (TM) POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
5.3	ANÁLISE DO SORO DOS ANIMAIS COM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS.....	51
5.4	TERAPIA CELULAR “ <i>in vitro</i> ” COM CÉLULA TRONCO DE MEDULA ÓSSEA CANINA EM CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO.....	52
5.4.1	Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das TM tratadas com CTM	52

5.4.2	Avaliação do ciclo celular demonstra que a CTM induz apoptose nas células tumorais mamários caninos	55
5.4.3	Avaliação da expressão da caspase 3 ativa e das proteínas Bax e Bcl-2, envolvidas da regulação da apoptose	57
5.4.4	Avaliação do potencial elétrico mitocondrial nas mitocôndrias isoladas dos tumores de mama canino.....	59
5.4.5	Avaliação da apoptose pelo teste de Anexina V/PI	60
5.4.6	Nível de expressão citoplasmática dos receptores de COX-2 e IL-6 nas TM tratadas com CTM	62
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO	88

1 INTRODUÇÃO

Em cães, o tumor mamário constituem aproximadamente 52% de todos os tumores que afetam as fêmeas, possuindo uma elevada heterogeneidade biológica e histomorfológica, sendo que 50% são malignos (MACEWEN; WITHRON, 1996). A incidência de carcinoma mamário em cadelas é três vezes maior que a relatada nos seres humanos (BRODEY; GOLDSCHMIDT; ROSZEL, 1983; SORENMO, 2003) pode-se desenvolver em machos, raros em homens (STRANDBERG; GOODMAN, 1974), e estes são geralmente muito agressivos (SCHNEIDER, 1970). Vários aspectos, incluindo fatores hormonais, nutricionais e genéticos têm sido relacionados com o desenvolvimento de tumores mamários (SORENMO et al., 2011). Um forte indicativo do fator hormonal contribuindo para o desenvolvimento de neoplasias mamárias é a diferente incidência que ela apresenta entre cadelas inteiras e castradas em diferentes tempos (FELICIANO et al., 2012).

O crescimento tumoral contínuo e o desenvolvimento de metástase dependem de um processo de mudança na homeostase do tecido sendo fisiológica ou patológica levando ao desequilíbrio e resultar na formação de um fenótipo maligno. Não se sabe se o tumor quebra esse equilíbrio e estimula a angiogênese ou se ele adquire características de malignidade a partir de um fenótipo angiogênico já existente (RESTUCCI et al., 2000). A alta mortalidade associada ao câncer de mama está na capacidade de invadir tecidos adjacentes, como linfonodos por via hematogênica para órgãos à distância levando a um péssimo prognóstico com recidiva precoce e curto período de sobrevida (FILDER, 2003; SOHARA et al., 2005).

As opções de tratamento dependem do estágio em que se encontra o tumor, do tipo histológico e estadiamento clínico. As terapias mais utilizadas incluem a excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia ou uma combinação desses tratamentos (NOVOSAD, 2003). A remoção cirúrgica completa, com amplas margens de segurança ainda é o tratamento de escolha, exceto para animais com diagnóstico de carcinoma inflamatório ou com a presença de metástases à distância (FELICIANO et al., 2012).

Atualmente o estudo dos marcadores se tornou de extrema importância na medida em que permite conhecer o comportamento biológico e evolução clínica das neoplasias de mama em cadelas, à semelhança do que é padronizado em mulheres (CASSALI et al., 2011). O estudo da expressão dos genes relacionados à pluripotencialidade torna-se uma ferramenta auxiliar para determinação das características tumorais e planejamento terapêutico (BOIANI et al., 2005; PANG; ARGYLE, 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Em cadela a neoplasia mamária tem sido muito investigada, principalmente por servir de modelo para o estudo do câncer de mama na mulher (MARTINS; FERREIRA, 2003). Os tumores mamários dos caninos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas semelhantes aos da espécie humana como a faixa etária de aparecimento, morfologia, efeito protetor da ovariectomia, presença de receptores de estrógeno e progesterona na massa tumoral, órgãos alvo de metástase, evolução clínica e a hereditariedade em alguns casos e apresentam genótipo antigênico comparável àquele observado em lesões de mama em seres humanos com homologia entre ambos os genes (SILVA et al., 2004).

Os tumores mamários malignos disseminam-se pelas vias linfáticas e sanguíneas para os linfonodos regionais e pulmões, a metástase pode ocorrer em 25 a 50% das cadelas com tumores mamários malignos (HEDLUND, 2002). Os linfonodos regionais (axilar e inguinal) podem estar aumentados quando houver metástase (NELSON, 1992), e seu envolvimento piora o prognóstico (BELLA, 1998), que pode ser, para ambas as espécies, reservado a mau (HARVEY, 1996), assim os carcinomas possuem um prognóstico melhor que os sarcomas (MACAW, 1996).

Os adenomas da glândula mamária ocorrem em dois tipos histológicos básicos, o intraductal e o lobular (JONES et al., 2000). Os adenomas intraductais, às vezes são conhecidos como papilomas intraductais, e têm origem nas células epiteliais e dos grandes ductos mamários e dos ductos interlobulares, podem ser solitários, mas frequentemente são numerosos e os ductos afetados estão frequentemente císticos (JONES et al., 2000). Os adenomas lobulares, também chamados de adenomas acinares ou tubulares, dependendo do tipo de crescimento, são neoplasias epiteliais benignas com origem nos ácinos mamários ou nos pequenos ductos intralobulares de diagnóstico, especialmente quando são secretórios da hiperplasia lobular. Um aspecto diferencial bastante útil é a presença ou a ausência de ductos intralobulares. Esses ductos não são encontrados nos verdadeiros adenomas, mas estão presentes nos lóbulos hiperplásicos. As margens da neoplasia são bem definidas e os tecidos adjacentes podem estar comprimidos, indicando um crescimento por expansão, e não por invasão (JONES et al., 2000). Sua morfologia é complexa que resultado da presença de células epiteliais e mesenquimatosas em estreita associação, o que coloca em questão a sua histogênese e o estroma, de natureza fibrovascular de aparência fibrosa, cartilaginosa ou óssea

(PELETEIRO, 1994), que proporciona a estrutura de sustentação para o crescimento e os nutrientes necessários para a manutenção das células neoplásicas é uma extensão do tecido normal adjacente que é estimulado a proliferar e crescer no tumor, pela ação de fatores secretados pelas células neoplásicas (JONES et al., 2000). Todos os dois tipos celulares podem existir nos tumores benignos e malignos. A interação do parênquima com o estroma neste microambiente é o início do processo neoplásico (MISDORP et al., 1999).

Os tumores são caracterizados por uma morfologia complexa composta por dois elementos básicos: o primeiro é o parênquima. O segundo elemento corresponde ao que. O estroma de uma neoplasia

O rápido desenvolvimento das glândulas mamárias durante a puberdade, período em que a ação estrogênica é acentuada, pode contribuir para a formação de clones e células alteradas, o que predispõem a formação de nódulos hiperplásicos, desta forma propiciando condições necessárias para as mutações genéticas (PELETEIRO, 1994). A determinação da origem dos diferentes elementos celulares que compõem os tumores, bem como de fatores que contribuem para transformação maligna são importantes para o entendimento do comportamento e evolução destes tumores, no entanto são aspectos que permanecem não elucidados. Alguns fatores moleculares com potencial valor prognóstico no câncer de mama canino permitiram a identificação de novos fatores prognósticos, alguns desses fatores incluem a presença de marcadores moleculares, expressão de receptores como a cicloxigenase-2 (COX-2), mutações no gene p53, marcadores da taxa de proliferação celular e mais recentemente a identificação de células-tronco cancerígenas ou células-iniciadoras de tumor (CITs) que possuem capacidade de divisão assimétrica, resistência à apoptose e propriedades para exclusão de corantes e quimioterápicos. A identificação de receptores celulares e moléculas relacionadas à progressão tumoral permite a caracterização do imunofenótipo das células neoplásicas, constituindo fatores prognósticos e preditivos importantes para tornar a escolha do tratamento mais específica e direcionada para cada paciente (BOIANI et al., 2005; PANG; ARGYLE, 2010; CASSALI et al., 2011).

Como a exemplo de CEA, CA 125, osteopontina, IGF-1, EGFR e mucinas, (NOSSOV, et al., 2008; COTICCHIA; YANG; MOSES, 2008), são substâncias produzidas pelos tumores e que podem ser medidas na corrente sanguínea ou detectadas nos tecidos, por método de imunohistoquímica (DERCHAIN; DUARTE-FRANCO; SARIAN, 2009). Na tentativa de aumentar a especificidade e sensibilidade dos testes, o Grupo Europeu de Marcadores Tumorais (EGTM) publicaram uma recomendação para o acompanhamento de

pacientes com câncer de mama utilizando a combinação de marcadores tumorais séricos, antígeno carcinoembrionário (CEA) e CA 15.3 (MOLINA et al., 2005).

Antígenos oncofetais antígeno são proteínas expressas em altos níveis nas células tumorais e em fetos de desenvolvimento normal, mas não em tecidos adultos, estes genes codificados são silenciados durante o desenvolvimento, sendo reativados durante em transformações malignas. Os dois antígenos oncofetais mais extensamente caracterizados são os antígenos carcinoembrionário (CEA) e alfafetoproteína (AFP) (MOLINA et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007).

O antígeno carboidrato 15 (CA 15-3) é uma glicoproteína de 300 a 400Kd produzida pelas células epiteliais glandulares, mais sensível e mais eficiente que o CEA (TOUITOU; BOGDAN, 1998). O CA 15.3 possui importância fundamental no acompanhamento da evolução do câncer de mama na mulher, podendo preceder os sinais clínicos em até 13 meses. Sua sensibilidade varia de acordo com a massa tumoral e o estadiamento clínico da doença (ALMEIDA et al., 2007), apresentando níveis séricos elevados em 60 a 80% das pacientes com metástases em câncer de mama (CHEUNG et al., 2000). Segundo trabalho realizado por Park et al. (2008) em mulheres portadoras de carcinomas mamários, níveis séricos elevados do marcador no pré-operatório estão associados a um pior prognóstico da doença.

O antígeno carboidrato 125 (CA-125) é formado por uma glicoproteína de alto peso molecular, detectado por anticorpo monoclonal (OC-125). Pode encontrar-se elevado em várias neoplasias, tais como: tumores malignos e benignos de ovário, endométrio, mama, pulmão, bexiga, hepatocarcinoma, linfoma (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2001).

O CA-19-9 é um antígeno carboidrato de superfície celular, sendo também conhecido como antígeno de Lewis. É liberado na superfície da célula cancerosa e penetra na corrente sanguínea, onde pode ser detectado (ALMEIDA, 2004; GOMES, 1997). O CA 19.9 possui sensibilidade variável com a localização do tumor: pâncreas 70% a 94%, vesícula biliar 60% a 79%, hepatocelular 30% a 50%, gástrico 40% a 60% e colorretal 30% a 40%. Em menor frequência, positiva-se também no câncer de mama, de pulmão e de cabeça e pescoço (ALMEIDA, 2004).

O estrógeno e a progesterona atuam nas células alvo durante os estádios iniciais da carcinogênese mamária, mas parecem perder seus efeitos estimulatórios durante os estádios finais da doença (FERRI, 2003). Animais com tumores de mama contendo receptores de estrógeno e progesterona, ou somente receptores de estrógeno, apresentam melhor prognóstico que aqueles que possuem somente progesterona, visto que a presença dos primeiros correlaciona-se com tumores bem diferenciados (MIALOT et al., 1981; SARTIN et

al., 1992), Estes receptores estão presentes em maior quantidade nos tumores benignos em relação aos malignos (NIETO et al., 2000). Também foi observado que há perda da expressão de receptores de estrogênio na maioria das metástases à distância (RUTTEMAN et al., 2001). O estrogênio e a progesterona modulam diretamente as vias do receptor para o fator de crescimento e os proto-oncogenes, promovendo o crescimento, diferenciação e sobrevivência celular, de forma similar, a transdução do sinal, através dos receptores de tirosina quinase (RTKs) localizados na superfície do epitélio mamário, desempenha importante papel no desenvolvimento do câncer de mama (HYNES; LANE, 2005; SERGINA et al., 2007; TANEJA et al., 2010). Hormônios produzidos na glândula pituitária podem estar implicados no desenvolvimento destas neoplasias. A prolactina (PRL) e o hormônio de crescimento (GH) podem aumentar ou diminuir as taxas de proliferação, atrofia ou diferenciação de células-tronco ou intermediárias. O excesso do hormônio do crescimento (GH) pode influenciar o aparecimento de tumores de mama na cadela (SELMAN et al., 1994), o que pode promover a estimulação da proliferação de células epiteliais mamárias transformadas (VAN GARDEREN et al., 1997).

O hormônio de crescimento (GH) tem a importante função de renovação e reparação de tecidos corpóreos, principalmente na idade adulta, aumento da captação de aminoácidos pelas células e redução da quebra de proteínas celulares. O GH tem a capacidade através do seu mediador peptídeo IGF-1, em influenciar a regulação do crescimento celular (JENKINS; MUKHERJEE; SHALET; 2006). Para estimular a proliferação do epitélio mamário, o GH age através da indução de fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (“insulin-like growth factor I and II”; IGF-1 e IGF-2) (GARDEREN et al., 1997; KHANDWALA et al., 2000). O epitélio que tem seu crescimento estimulado pelo GH, por vezes pode estar transformado, promovendo assim a formação de tumores (GARDEREN et al., 1997), o que reforça a possibilidade de relação do GH com desenvolvimento tumoral. Logo, de forma indireta, a progesterona também está relacionada (RUTTEMAN et al., 2001).

Em canídeos, o estímulo inicial para a produção autócrina de GH está relacionado com os níveis endógenos de progesterona e com a administração exógena de progestagênios sintéticos (SELMAN et al., 1994; RIJNBEEK; MOL, 1997).

Outro hormônio atualmente despertou interesse é a gonadotrofina coriônica humana (hCG) é uma glicoproteína hormonal produzida pelas células trofoblásticas sinciciais nos líquidos maternos, é usado principalmente para a detecção e monitoramento de gravidez e doenças relacionadas com a gravidez, mas também é um marcador extremamente sensível e específico para diversos tumores, principalmente tumores trofoblásticos de origem em células

germinativas. A completa diferenciação da glândula mamária está associado ao efeito da fração β da gonadotrofina coriônica humana (β hCG) nas células totipotentes de mama (stem cells). O β hCG é capaz de causar alterações permanentes na expressão de determinados genes. Essa diferenciação celular se mostrou um potente inibidor da iniciação do processo de carcinogênese mamária (RUSSO et al., 2005a). As células alteradas somente serão detectadas como neoplasia após vários anos de progressão ao longo do período (RUSSO; RUSSO, 1982). O AFP (alfafetoproteína): é uma glicoproteína circulante normalmente sintetizada e secretada no desenvolvimento fetal pelo fígado e pelo saco vitelínico (ALMEIDA, 2004), com funções de transporte plasmático e de manutenção da pressão oncótica, desaparecendo no primeiro ano de vida (SCHWARTZ, 1993; GOMES, 1997). Níveis séricos de AFP podem estar significativamente elevados em pacientes com carcinoma hepatocelular, tumores de células germinativas e, ocasionalmente, cânceres gástricos e pancreáticos.

A osteocalcina é uma proteína produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea. É a principal proteína não colágena presente no osso, e que também tem sido implicado no controle da reabsorção óssea. Os tumores de mama, preferencialmente metastizam-senos ossos, interações bidirecionais entre as células tumorais e células ósseas proporcionam uma vantagem seletiva para o crescimento do tumor e pode levar à destruição óssea ou nova deposição de matriz óssea. (YIN et al., 2005; YONEDA; HIRAGA, 2005). Os osteoblastos são derivados da linhagem de células do estroma e são responsáveis pelo que estabelece nova matriz óssea (BOYCE; YONEDA; GUISE, 1999). Um fator importante que regulamenta a remodelação óssea é a interação direta entre osteoblastos e osteoblastos (MUNDY, 2002). No trabalho de Neri et al. (1989), um aumento na concentração de osteocalcina pode ser considerado como um marcador da atividade biológica dos osteoblastos recuperado durante a estabilização ou a regressão das lesões metastáticas esqueléticas terapeuticamente induzida.

Alteração mais frequente no DNA está nos genes envolvidos na regulação da transcrição nuclear e no ciclo celular, inativando os genes supressores (p53, BRCA1 e BRCA2) (DENG; BRODIE, 2001). Paralelamente ocorre a ativação dos proto-oncogenes em oncogênese, que confere alterações suficientes para que a célula progrida para as fases da carcinogênese. Os principais proto-oncogenes ativados no câncer de mama são: HER-2, c-MYC, EGFR, RAS e BCL-2 (BARROS, 2010).

O gene supressor TP53 localiza-se na região cromossômica 17p13 e seu produto desempenha um papel fundamental na resposta aos insultos genotóxicos, levando tanto à parada da proliferação como à morte celular por apoptose (POETA et al., 2007).

Normalmente se encontra em baixa concentração por apresentar uma meia-vida curta (REIHS AUS et al., 1990). O dano do DNA leva a ativação do p53 (LEVINE, 1997). A ativação do p53 impede a proliferação celular ativando a apoptose (OSIN; LAKHANI, 1999; BORRESEN-DALE, 2003). Mutações no gene p53 induzem a expressão de fatores pro-angiogênicos, como VEGF (MICHAEL et al., 1998).

A apoptose e a proliferação celular possuem uma participação importante na tumorigênese, determinando o crescimento tumoral e consequentemente sua agressividade. A apoptose é a via de morte celular que é induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. Sabe-se atualmente que existem múltiplos e variados mecanismos de morte celular, sendo que alguns requerem a presença de Caspase-3 (STRANSSER; O'CONNOR et al., 2000), além das alterações na p53, as células tumorais podem produzir quantidades excessivas de Bcl-2, que previne a apoptose.

A proteína Bcl-2 atua como um regulador primário do ciclo celular, impedindo a apoptose, pois inibe a liberação de citocromo-c (REED, 1994; CHORNA; DATSYUK; STOIK, 2004), induzida pela p53 (INOE; AMAR; CERVANTES, 2005). O crescimento tumoral apresenta anormalidades na regulação da proliferação, da diferenciação e na sobrevivência celular. Essas células tumorais são capazes de produzir o seu próprio fator de crescimento, aumentando, assim, sua taxa de divisão celular. Com o aumento de divisão celular, as células neoplásicas falham em se diferenciar e em atingir a apoptose, que é a morte celular programada que pode ocorrer tanto quando se têm células defeituosas no tecido (ALBERTS et al., 2004).

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular, ele é expresso em todas as fases do ciclo celular exceto na fase G₀, é um excelente marcador de proliferação celular no diagnóstico, malignidade e prognóstico de carcinomas mamário (PENÃ et al., 1998; FITZGIBBONS et al., 2000). De acordo com Penã et al. (1998), valores aumentados de Ki-67 têm correlação positiva com metástase, morte pela neoplasia e menos tempo de sobrevida. A avaliação da fração do crescimento pelo índice proliferativo de Ki-67 é altamente preditiva no comportamento de várias neoplasias caninas e tem sido aplicado como um marcador de proliferação celular útil em muitas neoplasias humanas (MILLANTA et al., 2002).

As células cancerígenas e as células tronco embrionárias compartilham muitas propriedades biológicas fundamentais, auto renovação e pluripotência. A auto renovação e pluripotência são as características centrais na definição de células estaminais embrionária,

em que Oct 3/4 e Nanog desempenham um papel fundamental na manutenção destes processos (BOIANI; SCHOLER, 2005; NICHOLS et al., 1998). Contudo, estudos anteriores demonstraram que os fatores de transcrição nucleares OCT 3/4 e Nanog, estão expressos em diversos tipos de tumores, incluindo tumores de mama, implicando no seu desenvolvimento, na auto renovação e tumorigênese (EZEI et al., 2005). Oct 3/4 é um dos primeiros fatores de transcrição que é codificado por um gene contendo homeobox chamado POU5f1, este gene é reconhecido como fundamental função na manutenção da pluripotência e auto renovação nas células estaminais embrionárias (PESCE; SCHOLER, 2001). NANOG também é um fator de transcrição homeobox chave na manutenção da pluripotência (RODDA et al., 2005).

Além da proliferação e pluripotência celular, o tumor necessita promover a neovascularização necessária para suprir sua demanda nutricional. Atualmente o câncer deixou de ser considerado apenas um grupo de células mutadas e sim considerado como um microambiente tumoral, onde a interação de células geneticamente alteradas, células normais (como fibroblasto, células imunes, células endoteliais), vasos, e substâncias produzidas localmente, tem se mostrado um ambiente eficaz no desenvolvimento tumoral (HANAHA; WEINBERG, 2000). O microambiente do tumor apresenta uma excelente oportunidade para abordagens prognósticas e terapêuticas inovadoras para o câncer (GLAIRE et al., 2012).

Da mesma forma que as células tumorais invadem os tecidos normais, células do hospedeiro, como células endoteliais e perícitos, são recrutadas pelo tumor, invadindo-o, formando uma nova arquitetura vascular, que compõem o microambiente tumoral. Esse processo é chamado de angiogênese. Formando assim novas rotas para nutrir o tumor, proporcionando efluxo de células tumorais para circulação hematogênica ou linfática, resultado assim na disseminação sistêmica do tumor. A etiologia de algumas doenças é determinada pela resposta angiogênica persistente devido a um aumento dos mediadores angiogênicos ou deficiência dos inibidores de angiogênese (HANAHA; WEINBERG, 2000).

Alguns fatores de crescimento e seus receptores também estão envolvidos no desenvolvimento e progressão das neoplasias mamárias em canídeos, como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e seu receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) (NERURKAR et al., 1987; DONNAY et al., 1996), e o receptor tipo 2 para o fator de crescimento epidérmico (c-erbB2) (AHERN et al., 1996) e mais recentemente o fator de crescimento insulina tipo 1 (IGF-1) (OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS et al., 1999).

A família EGFR consiste de quatro receptores de tirosina quinase: HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4. O EGFR está envolvido no crescimento e no desenvolvimento normal da mama. A super-expressão de HER-2 tem sido associado a diferentes tipos de tumores, a

ativação desse receptor dispara a cascatas de sinalização intracelulares que podem levar à proliferação descontrolada, migração e surgimento de metástase, além da inibição da apoptose (HYNES; LANE, 2005) (Figura 1).

Figura 1 - Esquema demonstrativo do potencial das vias de sinalização dos receptores de membrana EGFR e HER-2

Fonte: (PRENZEL et al., 2001, Adaptado por WILL, 2013).

Legenda: Regulação do microambiente tumoral mediada pela COX-2 via parácrina e autócrina promove aumento de PGE₂ (prostaglandina E₂). A ligação ao receptor EP2 promover a transativação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) PGE₂ que estimula uma cascata de sinalização dupla envolvendo ativação de fosfoenosit-3-quinase (PI3K) e da proteína quinase Akt, agindo diretamente no citoplasma para o núcleo regulando os fatores angiogênico, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) um estimulador da angiogênese, ativando via IL-8 afetando a proliferação celular, a transformação, a progressão do ciclo celular, na sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase. A super-expressão de HER-2, EGF e TGF- α regulam a produção de VEGF e outros fatores de crescimento de células cancerosas humanas, as quais estimulam a proliferação endotelial e permeabilização, através da ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico e a COX-2 e a proteína quinase ativada por miogênico (MAPK) (AKT).

A angiogênese é induzida por vias de sinalização de receptores como a tirosina quinase (RTKs), incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é o principal regulador da angiogênese em tumores. Ele é liberado por células tumorais, células em hipóxia, plaquetas e leucócitos. O VEGF se liga a receptores do tipo tirosina-quinase pertencente a família VEGFR. Tanto o VEGF como VEGFR desempenham um papel crítico na progressão tumoral (FERRARA, 2003, KILVAER, et al., 2010). A super-expressão de VEGF está associada aos tumores malignos, com presença de metástase (RESTUCCI et al., 2004).

O VEGF é um potente peptídeo angiogênico com ação no desenvolvimento de células tronco hematopoiética, remodelação da matriz extracelular e modelação de citocinas inflamatórias (PRADEEP et al., 2005). Os fatores VEGF-C e VEGF-D são produzidos pelos macrófagos associados ao tumor (TAMs) ativados (SCHOPPMANN et al., 2002).

O fator de crescimento do fibroblasto (FGF) é um polipeptídeo envolvido em vários processos normais e patológicos. Seus efeitos são mediados por receptores de FGF (FGFRs) que são receptores transmembranares tirosina-quinase. FGF tem um papel importante no desenvolvimento de diversos tumores (KILVAER et al., 2010).

As quinases são proteínas fundamentais no processo de divisão celular, estas proteínas são responsáveis por garantir o equilíbrio do ciclo celular (JOHNSON; WALKER, 1999). As quimiocinas proteína quimiotática de monócito 1(MCP-1), interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8, fator de hipóxia (HIF), ciclogênase 2 (COX-2) e metaloproteínases (MMPs) são fatores liberados pelas células tumorais, endoteliais e pela matriz extra celular que mediam a resposta angiogênica (SALCEDO et al., 2000) (Figura 2).

Figura 2 - Vias de sinalização da angiogênese. Os fibroblastos induzem a formação da matriz extracelular no microambiente tumoral, alterando a deposição de colágeno tipo I e III, levando a acelerar a progressão do crescimento tumoral

Fonte: (JACOB et al., 2006, adaptado por WILL, 2013).

Legenda: Estes fibroblastos são responsáveis por intermediar a resposta inflamatória, secretando quimiocinas e interleucinas IL-6, IL-1 e IL8, interagindo também com a microvascularização através da secreção de metaloproteínas MMP-2 e fatores de crescimento como VEGF, TGF β e HGF, que influenciam o epitélio adjacente.

São potenciais marcadores para modular a via da angiogênese as integrinas, a ciclooxigenase 2 (COX-2), cuja produção é estimulada por FGF que sintetiza prostaglandina E2 que é um estimulador da angiogênese. A COX-2 está diretamente relacionada com a expressão de VEGF (DOMINICI et al., 2001) (Figura 3).

A associação entre a inflamação e o câncer, mostra que a inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribuem ao surgimento e progressão do tumor. A complexidade das interações entre as células tumorais e o sistema imune do hospedeiro envolve diversas linhagens celulares e mediadores. A resposta imune em alguns hospedeiros pode inibir o crescimento tumoral levando a remissões espontâneas ou pode promover inflamação crônica induzindo a progressão tumoral e angiogênese (DOUGAN; DRANOFF, 2009).

Diversos estudos mostraram que células tumorais são capazes de regular expressões de citocinas pré-inflamatórias como IL-1 β e ciclooxigenase 2 (COX-2), quimiocinas e outros

mediadores como fatores pro-angiogênicos como IL-8 para favorecer o recrutamento de células imunes circulante (COUSSENS; WERB, 2002; BERASAIN et al., 2006; MUMM; OFT, 2008). Algumas vias de sinalização relacionadas à inflamação e envolvidas no desenvolvimento tumoral, como STAT3 (signal transductor and activator of transcription 3, ou transdutor de sinal e ativador de transcrição 3), pode ser ativado por interleucinas como IL-8, fatores de crescimento como EGF, VEGF e outros (BERASAIN, 2006; LIN; KARIN, 2007). Outra via envolvida é a via do NF- κ B (nuclear factor- κ B- ou complexo fator nuclear κ B), ele é o principal ativador da resposta imune e inflamação, e sua estimulação aumenta expressão de citocinas inflamatórias, como (IL-6 e TNF- α), quimiocinas, fatores de crescimento, metaloproteínas, moléculas de adesão e proteínas anti-apoptóticas (KRAUS, 2003; BRUNELLE et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Via de sinalização da resposta pró- inflamatória da IL-1 β ou TNF- β

Fonte: (Zhou et al., 2005, adaptado WILL, 2013).

Legenda: IL-1 β ou TNF- β , ativando via NF- κ B, o complexo (IKK) fosforila I κ B quinase, que se dissocia NK- κ B, o I κ B é ubiquitinado liberando o NK- κ B que entra no núcleo, ativando muitos genes que codificam quimiocinas, fatores proangiogênicos, moléculas de adesão, proteínas anti-apoptóticas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e COX-2)

IL-6 é uma citocina pleiotrópica com uma vasta gama de atividades biológicas em regulação imune, hematopoiese, inflamação e oncogênese (KISHIMOTO, 2010). IL-6 é um regulador bem conhecido de respostas imunitárias e um dos principais contribuintes para a

patogênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias, (ROSE-JOHN et al., 2007) e também tem sido implicada como um fator de crescimento potente para certos tipos de células tumorais, incluindo células de tumor da mama (SASSER et al., 2007).

IL-8 é uma quimiocinas envolvida na inflamação crônica, desempenha vários papéis como uma citocina pró-inflamatória por mediar a ativação e a quimiotaxia de vários tipos de células do sistema imunológico (WUYTS; PROOST; VAN DAMME, 1998; PALENA et al., 2012) e a promoção de angiogênese (KOCK et al., 1992; MOORE et al., 1998). IL-8 pode ser produzido por uma variedade de tipos de células envolvidas na inflamação, incluindo monócitos e células endoteliais. Duas fontes principais desta quimiocinas são monócitos e células endoteliais, as quais segregam IL-8 em resposta a vários estímulos, tais como a exposição a IL-1 ou TNF- α . Além disso, outros tipos celulares, incluindo fibroblastos, queratinócitos (LARSEN et al., 1998) e as células de tumor, podem secretar IL-8, particularmente sob condições de stress, tais como hipóxia ou exposição a agentes de quimioterapia (DESBAILLETS et al., 1997; XIE, 2001). Os efeitos biológicos de IL-8 são mediados através da ligação de IL-8 para dois receptores acoplados à proteína G da superfície celular, denominadas IL8RA (CXCR1) e IL8RB (CXCR2), que são expressos principalmente em neutrófilos, monócitos, células endoteliais e algumas células cancerosas (XIE, 2001; STILLIE et al., 2009). IL-8 é conhecida por participar na progressão do tumor pela promoção da resposta angiogênica de células endoteliais, o recrutamento dos neutrófilos para o local do tumor, e a proliferação, migração e sobrevivência das células tumorais (WAUGH; WILSON, 2008; GABELLINI et al., 2009). Já foi demonstrado que muitos tipos de carcinomas humanos, incluindo tumores da mama, cólon, cervicais, gástrico, ovário e pulmão, entre outros, expressam elevados níveis de IL-8 em relação aos tecidos normais (GABELLINI et al., 2009). Além disso, vários estudos clínicos em melanoma, bem como tumores da mama, ovário, próstata e tumor do cólon têm mostrado uma correlação direta entre séricos de IL-8 níveis e progressão da doença (XIE, 2001).

A ativação de receptores de IL-8 em células endoteliais é conhecida por promover uma resposta angiogênica (BRAT; BELLAIL; VAN MEIR, 2005; LI et al., 2003), estimulação da proliferação de células (TAKAMORI et al., 2000; KAMOHARA et al., 2007), sobrevivência e migração de células endoteliais vasculares e invasão (LANG et al., 2002; ARAKI et al., 2007; YAO et al., 2007). Além disso, é proposto que a expressão intratumoral de IL-8 pode ser um regulador chave no recrutamento de neutrófilos para o microambiente do tumor, com potencial consequência na promoção de metástases (DELARCO; WUERTZ; FURCHT, 2004).

Tumores sólidos são frequentemente infiltrados por células do sistema imune como linfócitos, macrófagos. (KIRKIN et al., 1998; ZENG, 2001). Infiltrados de macrófagos são frequentemente observados nos tecidos neoplásicos, podendo destruir células tumorais através da produção dos intermediários reativos do oxigênio (ROIs) e do TNF- α , e parecem estar envolvidos em processos de inflamação crônicos e estão associados à progressão tumoral e metástase. No microambiente tumoral, os macrófagos podem secretar certas substâncias que são capazes de estimular o crescimento neoplásico, dependendo do estágio e da natureza do tumor (KLIMP et al., 2002). Após a migração dessas células mononucleares para os sítios neoplásicos, ocorrem mudanças nas suas propriedades tanto fenotípicas quanto genotípicas (SHURIN; SALTER, 2009).

Densidades elevadas de macrófagos nos tumores estão relacionadas a maus prognósticos em diversos estudos, de tumores de mama, ovário, e estão correlacionadas com alto grau tumorigênese e metástase (CONDEELIS; POLLARD, 2006; LIN et al., 2001).

Os macrófagos exercem papel fundamental na remodelação de matriz extracelular secretando enzimas proteolíticas (metaloproteínases) capazes de degradar a matriz extracelular, facilitando desta maneira, a disseminação das células tumorais, bem como secretar fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular VEGF) os quais podem favorecer o crescimento, a infiltração e metástase tumoral (COUSSENS; WERB, 2002).

A perda ou ausência da integridade das células mioepiteliais da camada basal é considerada um dos pré-requisitos para invasão tumoral e metástase (STERNLICHT et al., 1997). O processo da metástase é complexo, constituído de várias etapas, e que resulta das interações entre as células tumorais e o microambiente tecidual onde as células se encontram. Células neoplásicas passam por um processo denominado transição epitélio-mesenquimal, a célula de origem epitelial passa a expressar um conjunto de genes tipicamente do tecido conjuntivo, perdendo a características de diferenciação, polaridade e de interação intercelular com a matriz extracelular, neste processo há inibição de e-caderina e outras moléculas de adesão, e o citoesqueleto sofre modificações, este processo se completa com a expressão dos marcadores mesenquimais (vimentina e fibroactina), passando a ter a capacidade de invadir outros tecidos (POLYACK; WEIGELD, 2009).

A expressão de metaloproteínases de matriz extracelular (MMPs) também são controladas transcricionalmente por interleucinas, fatores de crescimento (EGF), fator de crescimento transformante α , (TGF- α) e fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), promovendo assim o crescimento tumoral. Outras moléculas, como CD44, regulam este processo (POZDNYAKOVA et al., 2009). O CD44 é uma molécula de adesão, multifuncional

e multiestrutural, pertencente à família de glicoproteínas transmembranares relacionada com a progressão tumoral (KLINGBEIL et al., 2009). Está envolvida nas interações célula a célula e entre a célula e a matriz celular (NAOR et al., 1997). O CD44 é expresso em maiores quantidades por células que expressam certos clones específicos da COX-2, e o bloqueio específico do CD44 diminui significativamente a capacidade de invasão das células tumorais (DOMINICI et al., 2001).

O CD44 tem sido envolvido na produção de citocinas, tais como a interleucina-8 (IL-8) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (ABBAS et al., 2000). Harrell et al. (2006) mostram que o CD44 é expresso em tumores primários e superexpresso em êmbolos tumorais linfáticos e metástases, concluindo que as subpopulações de CD44 no sítio primário são preferencialmente atraídas para os vasos linfáticos tumorais e seus linfonodos.

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo nos últimos anos, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. Diante desse cenário, justifica-se a necessidade do desenvolvimento de novas terapias para o controle do câncer.

2.1 TERAPIA CELULAR

A terapia celular proporciona novas expectativas para o tratamento de diversas patologias que acometem diversas espécies. O tratamento com células tronco mesenquimais multipotentes, atualmente, é muito utilizado na medicina regenerativa com alto potencial terapêutico devido à capacidade de auto-regeneração e diferenciação destas células (WANG et al., 2009; FODOR, 2003).

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células progenitoras multipotentes primeiramente isoladas a partir da medula óssea, são células progenitoras capazes de auto renovação (PROCKOP et al., 1997), de se diferenciar em células de linhagem-específicas e acredita-se que estas células são fundamentais para reabastecer tecidos adultos para manter a homeostase celular (LE BLANC et al, 2003; UCCELLI; PISTOLLA; NORETTA, 2007), e também tem gerado grande interesse sobre os efeitos imunomoduladores, especialmente sobre seu potencial anti-inflamatório para a sobrevivência e o desenvolvimento dos linfócitos (WELCH et al., 1990; DORSHKIND; LANDRETH, 1992).

Diversos estudos têm gerado As hCTMs foram capazes de suprimir a ativação de células do sistema imune inato, como células dendríticas (DC) e natural killer(NK). Inibem a diferenciação e maturação de DC, além de diminuir a expressão de moléculas co-estimulatória e alterar o perfil de produção de citocinas quando ativadas (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; NAUTA et al., 2006; CHEN et al., 2008), podendo assim atenuar a resposta inflamatória e reparação do tecido danificado ou manter uma resposta inflamatória crônica persistente levando a fibrose e deformação da arquitetura dos tecidos.

O perfil inflamatório do microambiente medular onde CTMs são expostas determina suas propriedades imunomodulatórias, já que, por exemplo, somente na presença de citocinas como IFN- λ ou TNF- α essas células adquirem caráter imunossupressor. Da mesma forma, outras moléculas solúveis podem contribuir para a geração de um perfil pró-inflamatório (WANG et al., 2012). Dessa forma, a plasticidade imunológica das CTMs relaciona-se diretamente com o tipo do estímulo inflamatório proveniente do microambiente medular.

As CTMs inibem o perfil de citocinas e a proliferação das NKT, por secretarem IDO (indoleamina 2,3 Dioxigenas), TGF- β e PGE₂ (KIM et al., 1997), e possuem propriedades citotóxicas através do contato célula-célula (SPAGGIARI et al., 2006). Esta interação com o estroma é fundamental para a promoção de um perfil imunossupressor ou pró-inflamatório, dependente de fatores solúveis provenientes de outras células imunorreguladoras, que são secretadas pelas CTMs no momento do distúrbio da hematopoese, visando assim a restauração da hematopoese tecidual (DAZZI et al., 2012). Segundo Shi et al. (2012) CTMs possuem esse imunofenótipo devido à baixa expressão de antígeno leucocitário humano (HLA) e por expressarem complexos de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e podem ser induzidas a expressar antígeno MHC classe II (MHC II) (LE BLANC et al., 2003; MAJUMDAR et al., 2003). CTMs não expressam moléculas co-estimuladoras de B7-1, B7-2, CD40 e o CD40L, por conseguinte não ativam células T aloreativas.

Embora vários grupos demonstrassem que CTMs têm a capacidade de inibir a proliferação de células T (GLENNIE et al., 2005; BENVENUTO et al., 2007), os mecanismos dos efeitos imunomoduladores de CTMs são ainda pouco compreendidos. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito imunomodulador de CTMs de cães, sem estímulo exógeno adicional, a fim melhor compreensão como é a populações celulares na modulação da resposta imune para possíveis aplicações clinicas em tumores de mama de cadela.

Para tanto, a relevância dessa pesquisa fundamenta-se em avaliar “in vitro” a resposta das células tumores quando tratada com as células tronco fetais de medula óssea canina, na tentativa de buscar por meio da biologia celular uma resposta das células tumorais de mama,

para que possamos avaliar se as células tronco fetais de medula óssea canina apresentam potencial antiproliferativos sobre o tumor de mama canino e quais os possíveis mecanismos e vias de sinalização envolvidas.

3 OBJETIVOS

Estabelecer e caracterizar a linhagem celular primária de tumor de mama canino, estudar “in vitro” a resposta das células tumores quando tratada com as células tronco de medula óssea canina, na tentativa de buscar por meio da biologia celular uma resposta das células tumorais de mama.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as linhagens de células de tumor de mama canino
- Avaliar a expressão celular utilizando marcadores de proliferação, morte, angiogênese e resposta imune;
- Avaliação da resposta tumoral quando tratada com célula tronco de medula óssea “in vitro”

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 38 tumores de mama de cadelas sem raça definida na faixa etária mínima de 6 anos, oriundos de Hospital Veterinário do Município de São Paulo. Os tumores foram encaminhados ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Após o diagnóstico histopatológico os tumores foram separados para o estudo em 3 grupos conforme o grau de malignidade: Grau I (adenocarcinoma) (n=8), Grau II (carcinoma com metástase linfonodo axilares) (n=22) e Grau III (carcinoma com metástase sistêmica) (n=8). O projeto foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) protocolo n° 2455/2011.

4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS DE TUMOR MAMA CANINO (TM)

As amostras dos tumores após a remoção cirúrgica foram maceradas com o auxílio de um bisturi, em pequenos fragmentos de 0,01 cm² e aderidas a placas de Petri, mantidas em estufa de cultura a 37° C e 5% de CO². As culturas iniciais foram mantidas em garrafas de cultura de 25cm² e em meio DMEM-High (LGC), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (VITROCELL), 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (GIBCO) 1% de ácido pirúvico (GIBCO), pH=7.4. As células foram analisadas morfolologicamente a cada 3 dias, utilizando um microscópio invertido (DSC Eclipse TS - 100).

4.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA CANINA (CTM)

Células-tronco mesenquimais da medula óssea canina fetais (CTMs) foram obtidos a partir do banco de células da anatomia da unidade de Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP e do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

As células mesenquimais de medula óssea de fetos caninos passaram pelo processo de descongelamento rápido em banho-maria 37°C. O *pellet* foi centrifugado para retirada do meio de cultivo. Foram realizadas duas lavagens em solução fisiológica em centrífuga a 24°C a 1000 rpm por um período de cinco minutos. As células foram mantidas em garrafas de cultura de 25cm² em meio de cultivo celular Alpha-MEM (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (VITROCELL), 1% de antibiótico penicilina e streptomina (GIBCO), 1% de aminoácidos não essenciais (GIBCO) e 1% de L- Glutamina (GIBCO), pH =7.4, em estufa a 37 ° com CO² a 5% umidificada. As células foram caracterizadas utilizando marcadores para viabilidade celular, vias inflamatórias e angiogênese para posteriores tratamento *in vitro*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - FMVZ-USP (protocolo número 931/2006).

4.3 CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CULTIVO CELULAR DO TUMOR DE MAMA

Todos os aspectos de crescimento celular foram acompanhados pela fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD- Sony. As células, cultivadas em placas de petri sobre lamínulas, foram fixadas em paraformol 4% por 2h, e fotografadas em microscópio invertido, acoplado a um sistema de captura de imagem CCD- Sony.

4.3.1 Imunocitoquímica

As alíquotas de células dos tumores (10⁴) foram cultivadas em placas de 24 wells sobre lamínulas de vidro. Após 48 horas, as células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com Tris (20 mM Tris-HCl pH 7,4, em 0,15 M de NaCl, e 0,05% de Tween-20) e fixado por 24 horas em 4% paraformaldeído. Após bloqueio com 5% BSA, as lamínulas foram incubadas durante a noite à 4 ° C com os anticorpos primários. Os anticorpos primários foram Vimentina (0.N.602, sc-73259, Santa Cruz Biotechnology), anti Stro-1 (sc-

47733, Santa Cruz Biotechnology) e anti β -tubulina (2146, Cell Signaling Tecnologia, Danvers, MA, EUA), VEGF (ab2349, Abcam®), anti OCT 3/4 (ab-18976, Abcam®). Após a lavagem três vezes em PBS, foi adicionado 1 μ g de anticorpo secundário e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora. Os anticorpos secundários foram ALEXAFLUOR 488 (A-11017, Life®), anti-IgG de coelho (DakoCytomation, CA, EUA), e anti-IgG de mouse (Chemicon International, Temecula, CA, EUA). As lâminas foram montadas com Vectashield com DAPI (H-1200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA). As imagens digitais foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha). Para controle negativo foi utilizado um isotipo um IgG (Clone Ci4, da Merck, Billerica, USA).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO (TM) POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após o crescimento e expansão celular, alíquotas de células de tumor de mama 10^5 foram ressuspensas em tampão FACS. Para os marcadores citoplasmáticos e nucleares, as células foram permeabilizadas com 5 μ L de 0,1% de Triton X-100 durante 30 minutos, e adicionados 1 μ L de anticorpos primário descrito no quadro 1, todos foram incubados por 3 horas a 4°C após foi adicionado 1 μ L de anticorpo secundário específico. A análise foi realizada utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), e as aquisições analisadas pelo programa Win Mdi 2.8.

Quadro 1 – Nomes, código e empresa fabricantes dos anticorpos

Anticorpo (código)	Fafricante
IL-1 (ab-7632)	Abcam®
IL-8 (ab-89336)	Abcam®
IL-6 (ab-6672)	Abcam®
CASPASE 3 (sc-7272)	Santa Cruz®
P53 (ab- 26)	Abcam®
KI67 (ab-15580)	Abcam®
OCT 34 (ab-18976)	Abcam®
NANOG (ab-80892)	Abcam®
Anti-progesterona (ab-2764)	Abcam®
VEGFr1 (ab2349)	Abcam®
CD34 (ab-8158)	Abcam®
CD44 (ab-119863)	Abcam®
BCL-2 (sc-7382)	Santa cruz®
BAX (sc-7480)	Santa Cruz®
Anti-estrógeno (ab-2746)	Abcam®
EGFR (ab-2430)	Abcam®
COX-2 (ab-23672)	Abcam®
TNF r1 (sc-52746)	Santa Cruz®
P21 - (sc-6246 AF488)	Santa Cruz®
P27 (sc-6246 AF488)	Santa Cruz®
ALEXAFLUOR 488 (A-11017)	Life®
HSP-47 (sc-8352)	Santa Cruz®
CD117 (RB-1518-R7)	Thermo Scientific
CD73 (sc-14684)	Santa Cruz®

4.5 ANÁLISE DO SORO DOS ANIMAIS COM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

As amostras de sangue foram coletadas no ato cirúrgico, e o soro obtido depois de, pelo menos, 30 min de coagulação por centrifugação a 2500g durante 15 min. Os soros foram removidos e usados de parâmetros bioquímicos e marcadores tumorais. Outros soros foram armazenados a -70°C até serem analisadas para a determinação de todos os parâmetros. Para fazer realizado o teste de quimiluminescência para CEA (antígeno carcinoembrionário), CA 15-3 (antígeno 15-3), hGH (hormônio de crescimento), AFP (alfafetoproteína), hCG

(gonatrofina coriônica humana), prolactina, estradiol, osteocalcina, CA19-9 (antígeno carboidrato 19-9), CA125 (antígeno 125), vitamina D e IGF-1(fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) pelo analisador de imunoensaio LIAISON® (DiaSorin SpA (DiaSorin)). O seu princípio do teste baseia-se na tecnologia de partículas magnéticas e quimioluminescência com uma cinética de luz de flash utilizando um derivado de isoluminol como um rótulo. As amostras são colocadas em prateleiras para 10 tubos cada. As amostras e os reagentes são transferidos através de agulhas de pipetagem. Os volumes das amostras de ensaio s testados a variar entre 10 a 100 µl. O volume máximo de vazios do instrumento é de 100 mL, dependendo do tipo de tubos primários. Os níveis de líquido de amostras, reagentes, entradas e líquido do sistema são controlados através de sensores. Os reagentes são armazenados em, uma zona de temperatura controlada e pode ser arrefecida continuamente recarregada. Até 15 diferentes Integrais reagentes podem ser carregados a bordo e processado por selecionáveis modos de funcionamento. A redução de dados baseia-se uma curva principal com um método de recalibração de dois pontos. O tempo necessário a partir de aspiração da amostra de primeiro resultado é de 34 minutos para o CEA, CA 15-3, AFP e 30 minutos para a GH, enquanto que a HCG leva 17 minutos. O método para a determinação quantitativa de CEA, CA 15-3, hGH, AFP e HCG são é um imunoensaio de quimiluminescência.

Para avaliação das culturas celulares, as células foram tripsinizadas depois centrifugada a 1800rpm desprezado sobrenadante, o precipitado celular foi imerso em nitrogênio líquido para lize celular, após este procedimento foi adicionado solução fisiológica para avaliação bioquímica, foram realizados o teste de quimioluminescência para CEA, CA 15-3, hGH, AFP, HCG.

4.6 TERAPIA CELULAR “*in vitro*” COM CÉLULA TRONCO DE MÉDULA ÓSSEA CANINA EM CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO

Todos os aspectos de crescimento celular foram acompanhados pela fotodocumentação das garrafas em microscopia invertida acopladas a um sistema de captura de imagem CCD- Sony e microscopia eletrônica de varredura.

4.6.1 Análise morfológica das células tumor de mama canino tratadas

As culturas de tumor de mama grau III foram mantidas em garrafas de cultura de 25cm² e em meio DMEM-High (LGC), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (VITROCELL), 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (GIBCO) 1% de ácido pirúvico (GIBCO), pH=7.4. As células foram analisadas morfolologicamente a cada 3 dias, utilizando um microscópio invertido (DSC Eclipse TS - 100).

4.6.2 Sistema de Co-cultura

Após o crescimento adequado as células cultivadas em frascos de cultura foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de cultura com sistema transwell, de 24 orifícios, cultivados na concentração 10⁵ células por orifício sobre lamínulas de vidro. As TM foram utilizadas para co-cultura como célula alvo, tratadas com as CTM.

As células CTM foram plaqueadas no compartimento superior da placa de transwell (Corning) e as células de TM no compartimento inferior. O cultivo foi realizado em meio de cultura DMEM High suplementado 10% de soro fetal bovino, 1% de aminoácidos essenciais e 1% de antibiótico, serão mantidas em estufas 37°C, durante 24 horas de tratamento. As células derivadas do cultivo foram fotodocumentadas, através da MEV, as células imediatamente após os tratamentos, foram fixadas em 3% de glutaraldeído por 1 hora a 4°C, no meio de cultura e pós-fixadas em OsO₄ 2% por 1 hora em temperatura ambiente. Após fixação, as células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações progressivas de etanol 10 a 100% por 10 minutos. As células foram secas com auxílio de um secador de ponto crítico, utilizando dióxido de carbono líquido e fixadas em porta espécie, com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas com uma camada de ouro de 35nm em *ion sputter coater* durante 2 minutos. As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura operado em 15Kv, sendo realizadas três fotomicrografias por amostras com aumento de 35 e 55 vezes. Desta forma foram acompanhados todo o desenvolvimento morfológico durante o crescimento e proliferação celular em cultura.

4.6.3 Análises das modificações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após os tratamentos as células utilizadas para a MEV, as células imediatamente após os tratamentos, foram fixadas em 3% de glutaraldeído por 1 hora a 4°C, no meio de cultura e pós-fixadas em OsO₄ 2% por 1 hora em temperatura ambiente. Após fixação, as lamínulas de vidro com células foram lavadas em tampão cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações progressivas de etanol 10 a 100% por 10 minutos. As lamínulas com as células foram secas com auxílio de um secador de ponto crítico, utilizando dióxido de carbono líquido e fixadas em porta espécie, com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas com uma camada de ouro de 35nm em *ion sputter coater* durante 2 minutos. As amostras foram avaliadas no microscópio eletrônico de varredura operado em 15Kv, sendo realizadas três fotomicrográfas por amostras com aumento de 35 e 55 vezes.

4.6.4 Ensaios de Proliferação com CFSE-DA

Para a análise de proliferação de TM foi calculada uma concentração de 10^5 de células, cada amostra foram ressuspensas em PBS 1x (Sigma-Aldrich) contendo 1 μ M de CFSE (5,6-carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester, Molecular Probes) e incubados a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação, para parar a reação foi adicionado 4 ml de PBS e de soro fetal bovino (10%), o excesso de CFSE foi lavado com 3X com PBS. Após a centrifugação as células foram colocadas em placas de seis poços, e foi adicionado 2 ml de meio DMEM-High completo, após os períodos de 24 as células foram adicionadas 10^4 de CTM e 48 horas, as células foram tripsinizadas e centrifugadas, o sobrenadante descartado e ressuspensas em 200 μ l de Tampão FACS Flow. A análise foi realizada utilizando um citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD).

4.6.5 Avaliação da expressão de marcador de proliferação celular Ki67 por citometria de fluxo

Após 24 horas de cultivo de TM na concentração de 10^5 , elas foram tratadas com CTM, na concentração de 10^4 por 24 horas. Após este período elas foram tripsinizadas e foram ressuspensas em tampão FACS, permeabilizadas com 5 μ L de 0,1% de Triton X-100 durante 30 minutos, após este período foram adicionados 1 μ L de anticorpos primário; KI67 (ab-15580) (Abcam®), todos foram incubados por 3 horas a 4°C após a incubação foi adicionado 1 μ L de anticorpo secundário específico. A análise foi realizada utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), e as aquisições analisadas pelo programa Win Mdi 2.8.

4.6.6 Análises das fases do ciclo celular

O efeito dos tratamentos foi avaliado quanto à capacidade de modificar a distribuição das células no ciclo celular. As análises foram determinadas pela quantificação do conteúdo de DNA por citometria fluxo, com a coloração de iodeto de propídio (PI). Células tumorais (10^6 /ml) foram plaqueadas em frascos de 75 cm² mantidas a noite. As células foram tratadas por 24 horas à 37°C, e após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% gelado mantido *overnight* a 4°C. As células foram tratadas com 40 mg/ml (PI), 10 mg/ml (RNase A), e analisados usando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA). Em seguida a aquisição dos dados em Citômetro de Fluxo FACS Calibur foram obtidos em 10.000 eventos, e adquirida pelo programa Modfit LT e FlowJo.

4.6.7 Avaliação da expressão da caspase 3 ativa e das proteínas Bax, Bcl-2, envolvidas da regulação da apoptose por citometria de fluxo

Após 24 horas de cultivo de TM na concentração de 10^5 , elas foram tratadas com CTM, na concentração de 10^4 por 24 horas. Após este período elas foram tripsinizadas e foram

ressuspensas em tampão FACS, permeabilizadas com 5 μ L de 0,1% de Triton X-100 durante 30 minutos, após este período foram adicionados 1 μ l de anticorpos primário; caspase 3 (sc-7272), Bcl-2 (sc-7382), e Bax (sc-7480) (Santa Cruz®), todos foram incubados por 3 horas a 4°C após a incubação foi adicionado 1 μ l de anticorpo secundário específico. A análise foi realizada utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), e as aquisições analisadas pelo programa Win Mdi 2.8.

4.6.8 Avaliação da expressão de reguladores da via pro a anti inflamatória por citometria de fluxo

Após 24 horas de cultivo de TM na concentração de 10^5 , elas foram tratadas com CTM, na concentração de 10^4 por 24 horas. Após este período elas foram tripsinizadas e foram ressuspensas em tampão FACS, permeabilizadas com 5 μ L de 0,1% de Triton X-100 durante 30 minutos, após este período foram adicionados 1 μ l de anticorpos primário; e Cox-2 (ab-23672), IL-6 (ab-6672) –(Abcam®) todos foram incubados por 3 horas a 4°C após a incubação foi adicionado 1 μ l de anticorpo secundário específico. A análise foi realizada utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), e as aquisições analisadas pelo programa Win Mdi 2.8.

4.6.9 Avaliação da apoptose por citometria de fluxo (Anexina V/PI)

As proporções de células apoptóticas foram detectadas utilizando o teste de externalização da fosfatidilserina marcada com Anexina V conjugado ao Isotiocianato de fluoresceína (FITC), (Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim-Germany), detectando as populações de células com os resíduos da fosfatidilserina expostos em sua superfície. As células também foram marcadas com PI, o que permite a discriminação entre as células apoptóticas e necróticas. A concentração de 10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e tratadas por 24 horas. Após, as células foram tripsinizadas com tripsina 0,2% e lavadas com PBS a 37°C e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. As células foram então incubadas com 4 μ g/ml de Anexina V e 1,8 μ g/ μ l de PI por 1 hora a 37°C, centrifugadas 2000 rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 400 μ l de tampão de ligação fornecido pelo fabricante. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra

em citômetro do fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, EUA) e pelo programa WinMDI 2.9 (Instituto de Scripps, La Jolla, CA, EUA).

4.6.10 Avaliação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

As células foram plaqueadas na concentração de 10^6 /ml células por poço na placa de 6 poços e cultivadas por 12 horas em estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C . Após o tratamento as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e foram adicionados em cada amostra 5 μ l de Rodamina 123 (5mg/mL) (Bernal et al., 1982). As amostras foram colocadas em estufa CO_2 (5%) à 37°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 200 μ l de tampão FACS Flow. A leitura e análise de marcação de Rodamina 123 nas células foram realizadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD) em intensidade de fluorescência FL1-H, utilizando o programa *cell quest*.

4.6.11 Análises estatística

Para a comparação entre três ou mais grupos os dados foram analisados pelo método de variância ANOVA seguido de teste comparativo múltiplo de *Tukey-Kramer* utilizando o Software Graph Prism. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) independentes, considerando-se como valores significantes * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram de culturas de células provenientes dos diferentes fragmentos dos tumores mamários nos diferentes graus de malignidade.

5.1 CARACTERIZAÇÕES DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO CULTIVO CELULAR DO TUMOR DE MAMA

Foi observado que as células provenientes dos diferentes fragmentos dos tumores mamários nos diferentes graus de malignidade adquiriram características semelhantes à fibroblastóides e epitelióides. As células do grau I, predominantemente havia células organizadas sob forma de colônias, com morfologias heterogêneas (Figura 4A-B). Os demais grupos após serem repicadas adquiriram morfologias de células grandes com grandes projeções citoplasmáticas, com formato fibroblasto-like (Figura 4C-F). Após a primeira semana de cultivo observou-se uma diminuição das epitelióides prevalecendo as células fibroblastóide.

Os resultados obtidos por microscopia confocal a laser através da imunocitoquímica observaram que os três grupos de culturas de células de tumor de mama canino expressaram Vimentina nos filamentos intermediários do citoesqueleto (Figura 4G-M). As linhagens de células derivadas dos três grupos de carcinomas apresentaram morfologia fibroblastóide, havendo diferença na morfologia apenas no grupo grau I, as células marcadas eram pequenas, fusiformes (escala de observação 100µm) (Figura 4 G-H), enquanto que as linhagens de células de grau II e III eram maiores e apresentavam morfologia fibroblastóide com citoplasma mais expandido e formavam processos citoplasmáticos mais desenvolvidos (escala de observação ao microscópio 50µm) (Figura 4 I-M).

Figura 4 - Aspecto morfológico, das linhagens celulares de tumor de mama

Fonte: (Will, 2013).

Legenda: A, B, C D e E: nota-se explante aderido à placa (seta), F: células formato fusiforme maiores e transparentes, 8 dias de cultivos; D, E e F colônias de células de tumor benigno, 5 dias após obtenção da mesma, nota-se explante aderido à placa (seta preta), células pequenas formando colônias (seta vermelhas). Aumento de 4x. Fotomicrográfas de imunocitofluorescência, fluorescência verde indica marcação para vimentina nos filamentos intermediários em os grupos de culturas de células de tumor de mama canino, (G-H) grupos grau I, (I-J) grupo II e (L-M) grupo III. Corado em azul os núcleos contra corados com DAPI. Barra de escala de 50 e 100 µm.

Nosso estudo em tumor de mama canino a expressão de marcador Ki67 de proliferação celular, foi significativamente maior nos grupos de tumores grau II e III, em comparação ao grupo I ($p < 0,001$), caracterizando o seu grau de maior proliferação,

representando correlações significativas entre os graus histológicos (Figura 5 A). Os resultados foram confirmados com o ensaio de CFSE-DA (Figura 5B).

Figura 5 -Proliferação celular

Fonte: (Will, 2012).

Legenda: (A) Histograma representando o marcador de KI 67 das culturas celulares dos tumores mamários caninos dos grupos I, II e III, (B) Histograma demonstrando índice proliferativo dos grupos de cultura de células tumores mamários caninos, (C) Gráficos demonstrando índice proliferativo dos grupos I, II e III das culturas de tumores mamários canino. Gráfico e de barras representando os valores de média $\pm$ DP.

5.2 CARACTERIZAÇÕES DAS CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO (TM) POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão de P53 mostrou-se significativamente menores nos grupos de tumores grau II e III, em comparação ao grau I ($p < 0.001$), caracterizando o seu grau de malignidade, o que foi comprovado pelo aumento p21. Nas células tumorais do grau III houve uma diminuição da expressão a expressão de p27 quando comparada ao tumor grau I ($p < 0.001$). A expressão de HSP-47 foi expressivamente maior nas células tumorais do de grau II e III (Figura 6A e B).

A expressão de receptores hormonais ER e PR nos diferentes grupos foram significativamente menores nos tumores de grau III quando comparada aos demais grupos,

enquanto o marcador CD73 mostrou-se uma correlação inversa nos tumores do grau III e menor nos tumores do grau I e II (Figura 6C).

Figura 6- Reguladores da progressão do ciclo celular e receptores hormonais em células de tumores de mama caninos

Fonte: (Will, 2012).

Legenda: (A) Histograma dos representando os valores de média $\pm$ DP para os marcadores de P53, P21, P27 e HSP-47, (B) Gráficos de barras representando os valores de média $\pm$ DP da expressão de marcadores envolvidos na progressão do ciclo celular de células tumorais das expressões de P53, P21, P27, Ki67 e HSP 47, (C) Gráfico de barra da expressão dos marcadores ER, PR e CD73. Gráfico representando os valores de média $\pm$ DP.

Analisando a via de morte celular, houve maior expressão da caspase-3 ativa e BAX no Grupo grau I ($p < 0,001$), enquanto que na expressão de Bcl-2 foi maior nos tumores de grau II e III (Figura 7A e B). A intensidade de fluorescência para a expressão de caspase 3 ativa foi observada com maior intensidade de marcação nas células de tumor de mama canino de menor grau de malignidade grupo grau I (Figura 7C 2), o mesmo não foi observado no tumor grau III (Figura 7C 8), para a marcação dos microtúbulos foi utilizado β -tubulina (verde)

Figura 7–Expressão de reguladores da via de morte por citometria de fluxo

Fonte: (Will, 2012).

Legenda: (A) Histograma da expressão de marcadores envolvidos nas vias envolvidas na morte das células tumorais de tumor de mama canino crescidas em monocamadas por citometria de fluxo das expressões de caspase-3 ativa, BAX e BCL-2, obtidos por citometria de fluxo, (B) Gráfico de barra da quantificação da expressão de marcadores envolvidos nas vias envolvidas na morte das células tumorais por citometria de fluxo das expressões de caspase-3 ativa, BAX (C) Fotomicrografias de imunocitofluorescência para as culturas de células de tumor de mama canino do grupo III com diferentes imunomarcações dos anticorpos. (C2-6) Foi observado a maior concentração de expressão de caspase 3 ativa no grupo grau I, (C7-9) grupo grau II com menor imunopositividade para caspase 3 ativa, PE (vermelho), imagens obtidas ao microscópio confocal. Barras 20μm.

A expressão de marcadores de “stem cell” dos grupos de culturas de células de tumor de mama canino do grau I, II e III mostrou positividade para os marcadores Oct $3/4$ e STRO-1 respectivamente, na região perinuclear e região citoplasmática próxima ao núcleo para todos os grupos de células tumorais (Figura 8A 1-2). A imunopositividade na região nuclear células tumorais foi observada pela imunomarcação de NANOG (Figura 8A 3) e positividade para vimentina no citoesqueleto (Figura 8AD).

As expressões de marcadores de “stem cells” das células tumorais dos diferentes tumores de mama canina mostrou um aumento significativo na expressão de Oct $3/4$ e CD 271 nos Grupos III ($p<0.001$) e II ($p<0.001$) e diminuição significativa da expressão do CD 90 ($p<0.001$) (Figura 8E). Os marcadores específicos para proliferação dos vasos D105, CD44 e CD34 expressaram-se significativamente nas células do carcinoma grau III. A expressão de marcador CD105 mostrou-se significativamente aumentado em células dos carcinomas de grau III ($p<0,001$) e II ($p<0,001$). A expressão de CD44 maior nos grupos de carcinomas grau II e III enquanto a expressão de CD34 foi maior apenas nos carcinomas grau III (Figura 8F e G).

Figura 8–Marcadores de célula tronco tumorais

Fonte: (Will, 2012).

Legenda: Fotomicrografias de imunocitofluorescência das células de carcinoma grau III (1) imunopositividade para Oct $3/4$ marcação positiva perinuclear, (2) imunopositividade para STRO-1 marcação citoplasmática, (3) imunopositividade nuclear para NANOG e (4) imunopositividade citoplasmática e citoesqueleto para Vimentina. (B) Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP para os marcadores de diferenciação celulares expressos células tumorais por citometria de fluxo das expressões de células tronco mesenquimais Oct $3/4$ e CD 271 e CD90 obtidos por citometria de fluxo. (C) Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP para os marcadores CD105, CD44 e CD34 obtidos por citometria de fluxo.

Todos os tumores grau I (Figura 9A 1e 3), Grau II (Figura 9A 2), grau III (Figura 9 A 4) apresentaram imunopositividade para a VEGFR. A expressão de VEGF foi significativamente maior nos de grau II e III das culturas de células de tumor de mama canina. O mesmo foi observado para COX-2, IL8 ra, IL-8 rb, EGFR e IGF-1 mostrando expressão dos marcadores que regulam as vias da angiogênese, mostraram-se significativamente aumentados em células do grupo III (Figura 9C-D).

Figura 9– Vias reguladores da angiogênese

Fonte: (Will, 2012).

Legenda: (A) Fotomicrografias de imunocitofluorescência para anticorpo VEGF foi observada nas células tumorais do grupo III, Imunopositividade para VEGF foi observada sobre o citoesqueleto e citoplasma. (B) Esquema das vias de sinalização dos reguladores das vias da angiogênese. Regulação do microambiente tumoral mediada pela COX-2 promove aumento de PGE₂ (prostaglandina E₂). A ligação ao receptor EP2 promover a transativação de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) PGE₂ que estimula uma cascata de sinalização dupla envolvendo ativação de fosfoenosit-3-quinase (PI3K) e da proteína quinase Akt, agindo diretamente no citoplasma para o núcleo regulando os fatores angiogênico, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos) um estimulador da angiogênese, ativando via IL-8 afetando a proliferação celular, a transformação, a progressão do ciclo celular, na sobrevivência, angiogênese, invasão e metástase. (C) Gráfico de barra da expressão dos marcadores das vias reguladoras da angiogênese. (D) Histograma e Gráfico de barra representando os valores de média ± DP para os marcadores de angiogênese expressas células tumorais por citometria de fluxo das expressões de VEGF, IL-8ra, IL-8rb, obtidos por citometria de fluxo

. A expressão de interleucinas IL-1 β da MCP-1 foi expressivamente maior nos carcinomas grau II e III quando comparada ao grupo I ($p < 0.001$). A expressão do marcador do receptor DR4 do TNF- α foi maior no grupo I, não havendo diferenças significativas nos demais graus. (Figura 10). Ainda analisando a via regulação a expressão dos marcadores de interleucinas IL-6, maior no carcinoma grau III (Figura 10).

Figura 10 - Expressão dos reguladores pro e anti-inflamatórios

Fonte: (Will, 2012).

Legenda: Gráfico de barras representando os valores de média $\pm$ DP para os marcadores envolvidos nas vias reguladoras da inflamação IL-6, IL-1 β , MCP-1 e rTNF α , obtidos por citometria de fluxo.

5.3 ANÁLISE DO SORO DOS ANIMAIS COM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

No homogeneizado protéico das células tumorais os níveis de CEA não apresentou diferença significativa entre os tumores grau I e II, tendo sua maior concentração dos grau III. Nosso resultado apresentou uma concentração elevada de CA 15.3 significativamente maior no grau III quando comparado com o grau I e II. A concentração de α -PH (alfafetoproteína) foi significativamente maior no carcinoma grau III quando comparado com os graus I e II. As concentrações dos marcadores tumorais solúveis mostram a diferença no GH e HCG foi maior

no carcinoma grau III ($p<0.001$) e II. As concentrações desses marcadores aos grupos de tumores malignos mostraram-se positivamente relacionados as suas características clínicas patológicas (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão das concentrações do tumor de CEA e CA 15.3 e alfafetoproteína GH e HCG nas cadelas dos grupos I, II, III

	Grau I	Grau II	Grau III
CEA (ng/mL)	0,16±0,09	0,1±0,64	0,2±0,4
CA 15.3 (ng/mL)	1,5±0,53	1,9±0,75	2,3±1,1
Alfafetoproteína (IU/ml)	2,5±0,78	5,9±0,89	7,6±1,5
GH (IU/ml)	17,4±0,19	23,9±1,34	24,6±0,6
HCG (IU/ml)	4,4± 1,54	12,2±0,85	14,2±0,3

Os níveis séricos dos marcadores (CA 19-9, AFP, CA125, CA 15-3), marcadores hormonais (Estradiol, progesterona, GH, HCG) e proteínas (osteocalcina, prolactina, IGF-1 e vitamina D estão apresentados na tabela 2). CA 15.3, CEA foram maiores no de grau III.

Os níveis séricos dos marcadores hormonais e HCG e GH foram significativamente maiores nos tumores grau III ($p<0,001$) e grau II ($p<0,01$) grau I e grupo controle (animais sadios), enquanto que a progesterona, estradiol e prolactina foram significativamente maiores no grupo grau II e III ($p<0,001$). Os níveis de alfafetoproteína foi significativamente menor nos de grau II e III (Tabela 2).

Os níveis de prolactina e IGF-1 foram significativamente maiores em todos os graus. Em contrapartida os níveis proteicos de vitamina D e osteocalcina foram significativamente menores nos de graus II e III. Os níveis séricos de CA 19-9 apresentaram um aumento na concentração não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis séricos dos marcadores tumorais e hormonais. Os níveis séricos de marcadores (CA 19-9, AFP, CA125, CA 15-3), marcadores hormonais (Estradiol, progesterona, GH, HCG) e proteínas (osteocalcina, prolactina, IGF-1 e vitamina D

	Controle	Grau I	Grau II	Grau III
GH (ng/ml)	0.17±0.04	0.21±0.06	0.52±0.05**	0.67±0.08***
CA 15-3 (U/ml)	3.06±0.42	5.08±5.73	10.34±3.50*	32.61±3.49***
Osteocalcina (ng/ml)	41.92±1.83	14.73±3.71	13.79±5.59**	7.3±1.05***
HCG mIU/ml	1.99±0.06	2.55±1.22	4.9±0.44**	6.93±1.49***
CEA (ng/ml)	0.79±0.07	1.87±1.38	2.75±0.91	3.35±0.83***
AFP (IU/ml)	98.62±6.41	139.78±7.86	17.74±13.68***	10.07±6.05***
Prolactina (mIU/ml)	7.56±1.55	11.67±3.84	23.31±4.26 **	39.98±9.11 ***
IGF-1 (ng/ml)	99.51±8.51	157.05±9.93	202.90±6.83 **	247.42±5.06 ***
Progesterona (ng/ml)	3.22±0.37	6.72±3.99 *	11.07±4.77 ***	11.27±2.97 ***
Estradiol (pg/ml)	171.45±2.11	159.71±10.76	370.68±10.63 ***	390.41±6.01 ***
CA125 (U/ml)	1.16±0.07	1.46±0.72	3.21±0.47 *	3.34±0.82 ***
VitD-250HD (ng/ml)	193.55±9.09	161.99±5.89	138.03±3.79 *	72.75±8.52 ***
CA19-9 (U/ml)	0.50±0.52	1.16±1.13	1.89±2.17	2.13±2.02

* GH= Hormônio de crescimento, CA 15-3= antígeno carboidrato 15-3, HCG= Gonotropina Coriônica humana, CEA= Antígeno carcinoembrionário, AFP= Alfafetoproteína, IGF-1= Fator de crescimento tipo insulina I, CA125= antígeno 125.

5.4 TERAPIA CELULAR “in vitro” COM CÉLULA TRONCO DE MÉDULA ÓSSEA CANINA EM CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA CANINO

Os resultados foram obtidos em ensaios de co-culturas com células de carcinoma grau III tratadas com CTM

5.4.1 Avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das TM tratadas com CTM.

No ensaio de co-cultura analisados por MEV demonstrou que as células CTMs estavam aderidas e espreiadas sobre superfície do poço superior da transwell. Observa-se durante o movimento celular, o desaparecimento de contatos focais (Figura 11 - 1). Antes da migração celular as CTMs demonstrando uma remodelagem do citoesqueleto, necessárias

para a movimentação das células CTMs (Figura 11 - 1 a 7). Foi observado com o tratamento das células TMTM (setas pretas) com CTM (setas azuis) e induziu perda da morfologia fibroblástica das células com retração citoplasmática, tornando as células com uma morfologia esférica (seta vermelhas) e o deslocamento para o outro substrato inferior pelos poros da placa de transwell (Figura 11 - 8 a 12). Não foram observadas diferenças morfológicas entre o grupo de células TM cultivadas por 24 horas na ausência das células de CTM, a membrana citoplasmática apresenta microvilosidades regulares e polimorfismo celular (Figura 11 - 13). Foi possível observar regiões na membrana celular com invaginações citoplasmáticas, retração dos filopódios e lamelipódios (setas amarelas) durante o tratamento com CTM (Figura 11 - 14 a 18).

As alterações morfológicas das células TM tratadas com CTM são distintas comparadas ao grupo controle, com modificações com formação de espículas além de diminuição significativa na quantidade de contatos focais, desaparecimento das microvilosidades, conseqüente perda de adesão a matriz e a formação esferóides, (Figura 11 - 14 a 18). Alterações morfológicas típicas de apoptose também foram visualizadas.

Figura 11 - Avaliação morfológica por MEV do ensaio de co-cultura das células de tumor de mama tratadas com CTM

Fonte: (WILL, 2013).

Legenda: Após 24 horas de tratamento com CTM (seta azul), TM (setas pretas), matriz extracelular (seta vermelha), filopódios e lamelipódios (setas amarelas) é possível observar mudanças morfológicas marcantes correspondentes a apoptose, com formação de corpos apoptóticos, redução das microvilosidades, perda de adesão a matriz (*) e formação de *bubbles* na membrana.

5.4.2 Avaliação do ciclo celular das TM tratadas com CTM

As modificações das fases do ciclo celular foram avaliadas após 24 horas de tratamento das TM com CTM na co-cultura. O efeito antiproliferativo dos tratamentos foram avaliados quanto a capacidade de inibir a progressão do ciclo celular. Os dois tratamentos das células TM resultaram em um acúmulo das células na fase G0/G1 comparando ao controle, além da diminuição das células na fase S e G2/M. Contudo, a morte celular por apoptose foi um efeito obtido em ambos os tratamentos com CTM (Figura 12). CTM (67,89%), (Figura 12) e no gráfico (Figura 12).

Figura 12 - Análise do ciclo celular das células Tumor de mama canino tratadas com CTM

Fonte: (WILL, 2014).

Legenda: Histogramas representativos da distribuição das fases do ciclo celular analisados por citometria de fluxo (A) TM tratadas com CTM após 12 horas, (B) TM tratadas com CTM após 24 horas, (C) TM tratadas com CTM após 48 horas, (D) TM tratadas com CTM após 72 horas. (E) Gráficos de barra representativos da distribuição das fases do ciclo celular analisados por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados de dois experimentos independentes. Valores de (* $p < 0,05$) foram obtidos pelo teste de variância *One-Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Tukey-Kramer*.

5.4.3 Avaliação da expressão da caspase 3 ativa e das proteínas Bax e Bcl-2

Após 24 horas de tratamento das células TM com CTM, foi observado aumento da atividade da caspase-3 ($17 \pm 1,4\%$), quando comparado ao Controle ($2 \pm 0,45\%$). Entretanto, o tratamento com CTM induziu aumento na atividade da BAX ($25 \pm 1,4\%$). Os tratamentos com CTM ($79,5 \pm 2,2\%$) ($40 \pm 2,8\%$) reduziram os níveis da proteína pró-apoptóticas Bcl-2, comparado ao controle (Figura 13A). Foi possível observar que a morte celular por apoptose induzida pelos tratamentos é dependente da caspase 3 ativa e das alterações do potencial elétrico mitocondrial.

O tratamento das células TM com CTM foram efetivos em induzir morte celular por apoptose em comparação às células não tratadas (Figura 13B).

Figura 13 - Avaliação da expressão das proteínas envolvidas no apoptose Bcl- 2, e Bax e caspase-3 nas células TM

Fonte: (WILL, 2014).

Legenda: (A) Gráfico de Dot PLOT ilustra a distribuição dos valores de caspase 3, Bcl-2 e Bax nos grupos de TM sem tratamento e TM tratadas com CTM. (B) Os tratamentos com CTM modificaram os níveis de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Em contraste, houve um aumento de expressão de BAX significativa (***) $p < 0.001$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

5.4.4 Avaliação do potencial elétrico mitocondrial nas mitocôndrias isoladas dos tumores de mama canino

As mitocôndrias das TM não tratadas apresentam elevado padrão de incorporação da sonda medido pelo $\Delta m\Psi$ (97%), que representam um padrão bioquímico estável e funcional. A presença do aumento da fluorescência verde FL1, como indicado no histograma mostra que as mitocôndrias das células tratadas com CTM apresentam importantes modificações funcionais com redução do $\Delta m\Psi$ (50% *low*), comparado ao controle (8% *low*). O overlay representativo das comparações das populações testadas versus a população controle, evidencia o potencial mitocondrial da CTM (Figura 14).

Figura 14 - Potencial de membrana mitocondrial analisado por citometria de fluxo

Fonte: (WILL, 2014).

Legenda: Histograma representativo do potencial mitocondrial no tratamento de cultura de célula de TM com CTM (10^4) e CTM (10^5). Quando comparado ao controle observou a redução do $\Delta m\Psi$, como indicado no histograma representativo, fluorescência verde (FL1). A população de mitocôndrias em (vermelho) como indicado no histograma representa uma população que está relacionada com aumento do $\Delta m\Psi$. Os resultados estão apresentados em porcentagem da duplicata de dois experimentos independentes.

5.4.5 Avaliação da apoptose pelo teste de Anexina V/PI

O perfil de análise da população de células de TM R2, positivos para iodeto de propídio (Q1), positivos para anexina V e iodeto de propídio (Q2), negativos para anexina V e iodeto de propídio (Q3) e positivos para anexina V (Q4) em gráfico de fluorescência 1 (Anexina V – FITC) em função de fluorescência 2 (Iodeto de propídio). O tratamento das células TM com CTMs aumento significativo, na proporção de células mortas por apoptose comparado às células não tratadas (controle) (Figura 15).

Figura 15 - Avaliação da apoptose pelo teste de Anexina V/PI

Fonte: (WILL, 2014).

Legenda: As células de tumor de mama canino grau III foram tratadas durante 24 horas com CTMs, e os efeitos avaliados por citometria de fluxo. (A) Gráfico representativo tipo *Dot plot* apresentando as diferentes populações de células em apoptose marcadas com Anexina V ou em necrose marcadas com PI. (B) Gráfico de barra representam à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. (** $p < 0,001$).

5.4.6 Nível de expressão citoplasmática dos receptores de COX-2 e IL-6 nas TM tratadas com CTM

Os níveis de expressão dos receptores de COX-2 foram reduzidos demonstrando que a CTMs podem modificar a sua intensidade. Esta hipótese foi confirmada pela técnica de microscopia confocal, onde foi possível observar os receptores distribuídos no compartimento intracelular, com redistribuição difusa próxima ao núcleo (Figura 16).

Figura 16 - Avaliação morfológica das células TM por microscopia confocal a laser

Fonte: (WILL, 2014).

Legenda: (A) Imunomarcacão de COX-2, (B) As células de TM foram tratadas durante 24 horas com CTM foram avaliadas por citometria de fluxo. (C) O nível de expressão de Cox-2 e IL-6 foi reduzido em todas os tratamentos. Os valores são apresentados em gráficos de barras expressos em média e desvio padrão de três experimentos independentes (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

6 DISCUSSÕES

O estudo dos mecanismos envolvidos na regulação das fases do ciclo celular de células neoplásicas tem mostrado ser útil na avaliação do comportamento biológico de tumores (O'REILLY; RICHARDS, 1992). O marcador de proliferação de Ki-67 apresentou maior expressão, nos tumores de grau III, seguida pelos demais grupos. Houve correlação da expressão do COX-2 com o índice de proliferação celular. Estes resultados são semelhantes aos descritos na literatura onde a expressão de COX-2 é um fator para o crescimento celular, desenvolvimento e progressão tumoral (BREYER; HARYS, 2001; ZHA et al., 2001; DONG et al., 2003; KRAUS, 2003).

Analizando os tumores, pode-se dizer que houve correlação inversa nos níveis do marcador de proliferação Ki-67, e os receptores hormonais (ER e PR), ou seja, quando a proliferação celular aumentava o número de receptores ER e PR diminuem, indicando que tumores bem diferenciados mantêm algum mecanismo hormonal regulatório. Estes achados estão associados ao índice de proliferação celular, e aumento de células em fase G0/G1, as quais são negativas para Ki67. Nos trabalhos de Peña et al. (1998) e Nieto et al. (2000) mostrou que o índice de proliferação celular e expressão de receptores de ER foram em tumor de alto grau de malignidade. Esses resultados estão de acordo com os achados no câncer de mama humano (WINTZER et al., 1991; RUDAS et al., 1994). Por outro lado os tumores benignos têm aumentado a expressão de receptores de progesterona, enquanto tumores malignos tem fenótipo inverso (MACGROGAN et al., 1996; GERALDES et al., 2000; THURÓCZY et al., 2007), Em nosso estudo, a expressão de receptores de ER e PR foi significativamente menor nos tumores de grau III e II.

O estudo das fases do ciclo celular de células neoplásicas tem mostrado útil na avaliação do comportamento biológico de tumores (O'REILLY; RICHARDS, 1992). A p53 tem a função de bloquear a divisão celular em células normais na forma não mutante através de uma proteína por ele produzida atuando como mediador da apoptose quando há ocorrência de alterações no genoma. Quando ocorre mutação neste gene, ocorre perda do controle do ciclo celular, ocorrendo distúrbios na apoptose (LOWE et al., 1994).

Nossos achados mostram que a expressão CD73 é um marcador de metastase foi positivamente relacionada com tumores que apresentaram à invasão de células de câncer de mama, migração e metástase linfonodal. CD73 é abundante em vários tipos de câncer (SPYCHALA et al., 2004; BAVARESCO et al., 2008). O que favorece o crescimento do

tumor através da supressão de funções anti-tumor de células T CD8 + (STAGG et al., 2011). Foi observado que a expressão de CD73 foi maior nos tumores grau III apresentando uma correlação inversa quando comparada a expressão de marcadores de receptores de ER. Spychala et al. (2004) mostraram em tumores que o ER regulou negativamente a expressão de CD73 em células de câncer de mama e que a falta ou perda de expressão ER, que é característica da doença mais avançada e agressiva. Outro aspecto importante da expressão de CD73 na angiogênese tumoral neste estudo foi a expressão dos receptores de VEGF e CD34 possa estar relacionado um fator prognóstico. Os dados revelaram que CD73 derivado de tumor aumenta a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelas células tumorais e a expressão de CD73 derivados das células hospedeiro é necessária para angiogênese e a proliferação de células endoteliais.

Corroborando com o estudo realizado por Hellemans et al. (1995) que não mostraram significado prognóstico para expressão do Bcl-2 nos pacientes com linfonodos negativos, mas o Bcl-2 negativo foi correlacionado com menor sobrevida global entre os pacientes com linfonodos positivos. Foi observada uma correlação da atividade de Cox-2 no câncer de mama pode estar envolvida com a expressão do Bcl-2, inibindo assim, os sinais de apoptose, permitindo desta forma maior tempo para o acúmulo de lesões genéticas múltiplas, resultando em transformação neoplásica (TSUJII et al., 1995; SURH et al., 2001; BOL et al., 2002). Os distúrbios apoptóticos, permitem que células malignas tenham maior sobrevida, contribuindo para que ocorra a expansão dos clones tumorais (DEVERAUX et al., 2001; OHASHI et al., 2006).

A expressão de COX-2 foi superior nos tumores de grau III, sugere que a Cox-2 pode ter um papel no potencial angiogênico e metastático. Mediadores da resposta inflamatória também são conhecidos por desempenhar papel importante na carcinogênese e atuam como um elo fundamental entre a inflamação e o câncer (FARREW et al., 2002; FARROW et al., 2004). No processo de progressão tumoral é possível que as células percam a capacidade de sintetizar a ciclooxigenase-2, assim como acontece, com a perda dos receptores de estrógeno e progesterona nos carcinomas mamários de pior prognóstico (PELETEIRO, 1994).

No trabalho de Li et al. (2013) a COX-2 regulou a expressão de genes múltiplos envolvidos na apoptose celular, migração e progressão do ciclo celular. Estudos anteriores mostraram que COX-2 era necessária para ao crescimento e migração de células de tumores pancreáticos. No presente estudo, a alta expressão de COX-2 correlacionou-se com os grupos que apresentaram indicadores de malignidade tumoral, como acometimento linfonodal, alta expressão de Ki67 e duplo negativo para receptores hormonais (ER e PR). Estes dados estão

de acordo com Gusterson et al. (2005), que correlacionaram uma super-expressão de COX-2 com pior prognóstico e com a presença de metástase. A marcação por imunocitoquímica revelaram uma imunomarcação perinuclear e nuclear mais intensa para a COX-2 nos grupos carcinomas grau II e III, estes padrões de marcação não estão descritos na mama neoplásica da cadela, no entanto, a marcação perinuclear já foi observada em tumores de mulher (RISTIMAKI et al., 2001) e em outros tumores caninos (MCENTEE et al., 2002). Este tipo particular de marcação perinuclear pode ser devido à pela presença da COX-2 ao redor do envelope nuclear (MORITA et al., 1995), no entanto, este estudo, este padrão de marcação foi exclusivo dos grupos de grau III com metástase, relacionando-se a ao pior prognóstico do tumor, corroborando com os resultados encontrados por Heller et al. (2005).

O IGF-1 é um potente agente mitogénico e inibidor da apoptose, estando também envolvido na estimulação da angiogênese (HOLDAWAY et al., 2003). A expressão de IGF-1 mostrou-se significativamente maior no carcinoma grau III o que também foi observado por Coskun et al. (2003) que observou níveis séricos de IGF-1 foram superiores em mulheres com tumor metastáticos, comparando a pacientes com tumores in situ (SINGER, 2004).

A expressão de IL-8ra e IL-8rb e IL-6 mostraram-se significativamente maior nos grupos de carcinomas grau II e III quando comparado ao grupo grau I. Segundo Uchiyama et al. (1992) a expressão de receptores de VEGF decorre do estímulo direto da IL-6 produzida pelas células do microambiente, o que foi acompanhado pelo aumento da IL8 ra e IL8 rb capaz de responder a fatores envolvidos na angiogênese tumoral.

A expressão do marcador IGF-1 nos graus II e II e EGFR foram maiores nos grupos III. A expressão de marcador de “stem cell” como o CD105 mostrou-se significativamente aumentados em células de carcinoma grau III e II, envolvido possivelmente na angiogêneses.

A expressão de CD44 neste estudo mostrou-se maior expressão no grupo de carcinoma grau III. Também observado no estudo de Harrell et al. (2006) CD44 foi expresso em tumores primários e superexpresso em êmbolos tumorais linfáticos e metástases, concluindo que as subpopulações de CD44 no sítio primário são preferencialmente atraídas para os vasos linfáticos tumorais e seus linfonodos. Looi et al. (2006) demonstraram também que conjunto de expressão do marcador CD105, CD44 e CD34 foi expressivamente maior, possivelmente modulando o processo da angiogênese.

Inflamação e angiogênese são processos fundamentais na progressão de muitas doenças, incluindo tumores malignos. A expressão dos marcadores IL-1 β , MCP-1 foram maiores nos grupos grau II e III quando comparada ao grupo I, com exceção TNF- α que apresentou expressão maior nos grupos dos tumores benignos.

Os demais marcadores solúveis em tumores de cadela e suas correlações são úteis no estadiamento destes tipos de neoplasias. Em cães, o estímulo inicial para a produção autócrina de GH está relacionada com os níveis endógeno de progesterona (SELMA et al., 1994), contudo, após este estímulo inicial, a partir do momento em que se desenvolve a lesão neoplásica mamária, a produção autócrina de GH parece torna-se independente do ambiente hormonal que envolve as células tumorais (VAN GARDEREN; SCHALKEN, 2002). Os níveis séricos de GH apresentaram aumentados nos grupos de tumores malignos de grau III e com metástases. Corroborando com os achados de Selman et al. (1994), que demonstraram aumento na produção do hormônio do crescimento (GH) pode influenciar o aparecimento de tumores de mama na cadela, pode levar a estimulação da proliferação de células epiteliais mamárias transformadas (VAN GARDEREN et al., 1997).

Nos tumores de grau III, também apresentaram uma correlação positiva entre os níveis de prolactina, GH, IGF-1 e o CEA. A concentração sérica de GH está associada os grupos de carcinomas que expressaram maior grau de proliferação e negativos para receptores de progesterona (MOL et al., 1995). A progesterona pode regular indiretamente a expressão de GH, através dos fatores derivados no estroma tumoral (GARCIA et al., 1996) vitamina D (VitD) inibe a ação da transcrição de ambos os ligantes de GH em ratos que expressam o gene para hormona de crescimento (GH). A inibição provocada pela vitamina D é devido à interferência de transcrição do receptor de vitamina D e elementos de resposta do DNA. Foi observada em nosso estudo menor concentração sérica de vitamina D 25(OH)D3 em carcinomas de mama avançado ou metastático (BERTONE-JOHNSON et al., 2005; LOWE et al., 2005; ABBAS et al., 2008).

A concentração sérica de hCG, CA 15-3 e alfafetoproteína foi significativamente elevada nas células de carcinomas grau III. Hoon et al. (1996), que beta hCG foi expressa em todas as linhagens de células tumorais de câncer de mama, 80% do câncer de mama primários. No trabalho de Cheung et al. (2000) níveis séricos elevados de CA 15.3 em 60 a 80% tumor em pacientes com metástases em câncer de mama.

A osteocalcina também se apresentou elevada nos grupos de carcinomas de grau II e III. Em mulheres com câncer de mama um dos principais sítios de metástase são os ossos (ARAUJO et al., 2009).

O presente estudo comparou o tratamento do tumor de mama canino, com CTM como uma nova modalidade terapêutica contra o câncer. Segundo a Agencia Internacional para pesquisa em Câncer IARC/ OMS (Word Cancer Report.), o impacto global do câncer mais

que triplicou em 30 anos. Torna-se fundamental o desenvolvimento de novas terapias para o controle do câncer.

No sistema de co-cultura TRANSWELL®, as CTM inibiram significativamente o crescimento das células TM. Durante o movimento celular, a formação e o desaparecimento de contatos focais permitem a motilidade das células. Células tumorais usam múltiplos mecanismos para escapar do sistema imunitário. Neste estudo o tratamento induziu alteração na morfologia, lise celular e consequente redução da densidade das células de TM. O efeito citotóxico das CTM co-cultivados sobre o crescimento das células TM foi analisado por microscopia de eletrônica de varredura. Estudos usando modelos animais mostraram que as células CTMs têm o potencial de migração para os tecidos injuriados, acompanhado por fatores pró-inflamatório pela resposta inata quanto a adaptativa (BITTIRA et al., 2003; WU et al., 2003; PITTENGER; MARTIN, 2004; LOEBINGER; JANES, 2014).

A progressão do câncer pode não ser simples resultado da ausência da resposta imune, porém da inabilidade de células imunitárias efetoras controlarem ou destruírem células tumorais. Os macrófagos assim como células dendríticas possuem importante papel imunomodulatório na resposta imune primária (GORDON, 2003; LIU et al., 2006). Nossos resultados confirmam isto, uma vez que o tratamento com CTM aumentou expressão de marcadores de morte, mas sim possíveis mediadores secretados ao meio de cultura mostrando alta capacidade de interação com as células tumorais.

A apoptose pode iniciar no terço final da fase G1, para impedir que uma célula que possua dano ingresse na fase de síntese (S), e na fase G2 impedi que as células cheguem a maturidade e entrem em mitose (DANIAL; KOSMEYER, 2004).

Todas as modalidades de tratamento modificaram a quantidade de células tumorais na fase sub-G1 com DNA fragmentado. A fase G0/G1 apresentou aumento nos tratamentos com, CTM, podendo indicar parada na proliferação ou quiescência. A desregulação do ciclo celular possui importante papel na resistência terapêutica das células tumorais (SMALLEY et al., 2007). Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Kumar et al. (2008) que as CTM suprimiram o crescimento de células tumorais por indução de diferenciação de células de tumor, a acumulação na fase S e apoptose, resultou redução da carga tumoral em todos estes modelos.

O nível de expressão de Ki67 correlaciona-se com a progressão de TM e seu potencial metastático, está intimamente ligado à proliferação celular (LADSTEIN et al., 2010). A diminuição da proliferação Ki67 em todos os protocolos de tratamento indica a diminuição

das células Tumorais, indicando a diminuição da proliferação das células tumorais, corroborando com os dados das proporções das fases do ciclo celular.

Os efeitos resultantes do aumento caspase 3 ativa foi analisado confirmado pelo teste de Anexina V/PI. O tratamento das células tumorais com CTM apresentou aumento significativo, na proporção de células mortas por apoptose. Nossos achados corroboraram com Loebinger et al. (2009), que demonstrou CTMs reduziu o crescimento de tumores subcutâneos em modelo de metástase sistêmica a formação de suas metástases.

O uso da terapia de CTMs poderia ser amplamente aplicável a vários tipos de câncer. Apesar de alguns tumores serem resistente aos efeitos dos mediadores pro e anti-inflamatórios, atuam em diferentes etapas das vias de morte celular ou de citotoxicidades, vias de morte. Por exemplo, a sub-regulação da expressão de Bcl-2 ou os danos no DNA causados pela quimioterapia que pode suprimir os efeitos da terapia celular (NAKA et al., 2002; UCUR et al., 2003; LOEBINGER et al., 2009). Os resultados quando as CTMs regularam a expressão Bcl-2 e Bax, e da caspase 3 ativa das células tumorais induzindo a inibição do crescimento.

7 CONCLUSÃO

As CTMs apresentaram um potencial terapêutico coadjuvante aos protocolos terapêuticos pré estabelecidos. Foi possível observar alterações morfológicas ultra estruturais nas células TM bem como, morte celular pela via da caspase 3 com aumento da expressão de Bax e redução Bcl-2 e a indução da apoptose pela inibição da COX-2. Com a resposta das células TM na presença de CTM podemos aferir que a CTM apresenta como ferramenta promissor no tratamento de tumor.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 553 p.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER P. **Biologia molecular da célula**. Tradução Ana Beatriz Gorine. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 341-348 p.
- ALMEIDA, J. R. C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. São Paulo: Atheneu, 2004. 61-72p.
- ALMEIDA, J. R. C.; PEDROSA, N. L.; LEITE, J. B.; FLEMING, T. R. P.; CARVALHO, V. H.; CARDOSO, A. A. A. Marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.3, p. 305-316, 2007.
- AHERN, T. E.; BIRD, R. C.; BIRD, A. E.; WOLFE, L. G. Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. **American Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 5, p.693–696, 1996.
- ARAKI, S.; OMORI, Y.; LYN, D.; SINGH, R. K.; MEINBACH, D. M.; SANDMAN, Y.; LOKESHWAR, V. B.; LOKESHWAR, B... Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 67, p. 6854–62, 2007.
- ARAÚJO, J.; LOGOTHETIS, C. Targeting Src signaling in metastatic bone disease. **International Journal Cancer**, v. 124, n. 1, p. 1-6, 2009.
- BARROS, A. C. S. D. Genética e epigenética: bases moleculares da formação inicial do câncer de mama. **Revista Brasileira de Mastologia**, v.20, n. 1, p. 48-54, 2010.
- BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; CAPPELLARI, A. R.; ROCKENBACH, L.; FARIAS, P. F.; WINK, M. R.; DELGADO-CAÑEDO, A.; BATTASTINI, A. M. The role of ecto-5' -nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 319, n. 2, p. 61–68, 2008.
- BELLA, H. J. R. Tratamento cirúrgico dos distúrbio cutâneos específicos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. v. 1, cap. 29, 427-429 p.
- BERTONE-JOHNSON, E. R.; BERTONE-JOHNSON, W. Y.; CHEN, M. F.; HOLICK, B. W.; HOLLIS, G. A.; COLDITZ, W. C.; WILLETT, S. E.; HANKINSON, M. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v. 14, p. 1991–1997, 2005.

BENVENUTO, F.; FERRARI, S.; GERDONI, E.; GUALANDI, F.; FRASSONI, F.; PISTOIA, V.; MANCARDI, G.; UCCELLI A. M. D. Human Mesenchymal Stem Cells Promote Survival of T Cells in a Quiescent State. **Stem Cells**, v. 25, p. 1753–1760, 2007.

BERASAIN, C.; CASTILLO, J.; PERUGORRIA, M. J.; LATASA, M. U.; PRIETO, J.; AVILA, M. A. Inflammation and liver cancer: new molecular links. **Annual New York Academy Sciences**, v. 1155, p. 206–221, 2009.

BITTIRA, B.; SHUM-TIM, D.; AL-KHALDI, A.; CHIU, R. C. Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction. **European Journal of CardioThoracic Surgery**, v. 24, p. 393-398, 2003.

BOIANI, M.; GENTILE, L.; GAMBLES, V.V.; CAVALERI, F.; REDI, C.A.; SCHÖLER, H.R. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. **Stem Cells**, v. 23, n. 8, p. 1089-104, 2005.

BOL, D. K.; ROWLEY, B.; HO, C. P.; PILZ, B.; SWERDEL, M.; KIGUCHI, K.; MUGA, S.; KLEIN, R.; FISCHER, M. Cyclooxygenase 2 overexpression in the skin of transgenic mice results in supression of tumor development. **Cancer Research**, v. 62, p. 2516-2521, 2002.

BORRESEN-DALE, A. L. TP53 and breast cancer. **Human Mutation**, v. 21, n. 3, p. 292-300, 2003.

BRAT, D. J.; BELLAIL, A. C.; VAN MEIR, E. G. The role of Interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. **Neuro-oncology**, v. 7, p. 122–33, 2005.

BREYER, M. D.; HARYS, R. C. Cycooxygenase-2 and the Kidney. **Current Opinion in Nephrology & Hypertension**, v. 10, p. 89-98, 2001.

BRODEY, R. S.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ROSZEL, J. R. Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.19, p.61-89, 1983.

BRUNELLE, M.; SARTIN, E. A.; WOLFE, L. G.; SIROIS, J.; DORE, M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 5, p. 656-666, 2006.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; DE NARDI, A. B.; FERREIRA, E.;BERTAGNOLLI, A. C.; ESTRELA-LIMA, A.; ALESSI, A. C.; DALECK, C. R.; SALGADO, B. S.; FERNANDES, C. G.; SOBRA, R. A.; AMORIM, R. L.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; AULER, P. A.; MAGALHÃES, G. M.; SILVA, J. O.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; OLIVEIRA, L. O.; MALM, C.; ZUCCARI, D. A. P. C.; TANAKA, N. M.; RIBEIRO, L. R.; CAMPOS, L. C.; SOUZA, C. M.; LEITE, J. S.; SOARES, L. M. C., CAVALCANTI, M. F.; FONTELES, Z. G. C.; SCHUCH, I. D.; PANIAGO, J.; OLIVEIRA, T. S.; TERRA, E. M.; CASTANHEIRA, T. L. L.; FELIX, A. O. C.; CARVALHO, G. D.; GUIM, T. N.; GUIM, T. N.; GARRIDO, E.; FERNANDES, S. C.; MAIA, F. C. L.; DAGLI, M. L. Z.; ROCHA, N. S.; FUKUMASU, H.; GRANDI, F.; MACHADO, J. P.; SILVA, S. M. M. S.; BEZERRIL, J. E.; FREHSE, M. S.; PAES DE ALMEIDA, E. C., CAMPOS, C. B. Consensus for the

Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p.153-180, 2011.

CHEN, G. L.; HAMMOND, H.; YE, Z.; ZHAN, X.; DRAVID, G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. **Stem Cells**, v.21, p. 131-142, 2003.

CHEUNG, K. L.; GRAVES, C. R. L.; ROBERTSON, J. F. R. Tumour marker measurements in the diagnostics and monitoring of breast cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 26, p. 91-102, 2000.

CHORNA, I. V.; DATSYUK, L. O.; STOIK, R. S. Expression of Bax, Bad and Bcl-2 proteins under x-radiation effect towards human breast carcinoma MCF-7 cells and their doxorubicin-resistant derivatives. **Experimental Oncology**, v. 27, n. 3, p.196-201, 2005.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate 6. partners for tumour cell migration, invasion and metastasis. **Cell**, v.124, p.263-266, 2006.

COSKUN, U.; GUNEL, N.; SANCAK, B.; GUNEL, U.; ONUK, E.; BAYRAM, O.; YILMAZ, E.; CANDAN, S.; OZKAN, S. Significance of serum vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1 levels and nitric oxide activity in breast cancer patients. **Breast**, v. 12, p. 104-110, 2003.

COTICCHIA, C. M.; YANG, J.; MOSES, M. A. Ovarian cancer biomarkers: current options and future promise. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 6, n. 8, p.795–802, 2008.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

DANIAL, N. N.; KOSMEYER, S. J. Cell death: Critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205–219, 2004.

DAZZI, F.; LOPES, L.; WENG, L. Mesenchymal stromal cells: a key player in ‘innate tolerance’? **Immunology**, v.137, p. 206–213, 2012.

DESBAILLETS, I.; DISERENS, A. C.; TRIBOLET, N.; HAMOU, M. F.; VAN MEIR, E. G. Up regulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.186, n. 8, p. 1201–1212, 1997.

DELARCO, J. E.; WUERTZ, B. R.; FURCHT, L. T. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 4895–900, 2004.

DENG, C. X.; BRODIE, S. G. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Cancer Biology**, v. 11, p. 387-394, 2001.

DERCHAIN, S. F. M.; DUARTE-FRANCO, E.; SARIAN, L. O. Panorama atual e perspectivas em relação ao diagnóstico precoce do câncer de ovário. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 4, p. 159-163, 2009;

DEVERAUX, Q. L.; SCHENDL, S. L.; REED, J. C. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and Inhibitor of Apoptosis Protein Families. **Cardiology Clinics**, v. 19, n. 1, p. 57–74, 2001.

DE VITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, A. S. Cancer - **Principles and Practice of Oncology**. 7. Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2.898 p.

DOMINICI, M.; CAMIONI, D.; LANZA, F.; LUPPI, M.; BAROZZI, P.; PAULI, S.; MILANI, R.; CAVAZZINI, F.; PUNTURIERI, M.; TROVATO, R.; TORELLI, G.; CASTOLDI, G. Angiogenesis in multiple myeloma: correlation between in vitro endothelial colonies growth (CFU-En) and clinical-biological features. **Leukemia**, v. 15, n. 1, p. 171-176, 2001.

DONG, M.; GOUDA, K.; NAMBIAR, P. R.; RESAIE, A.; BELINSKY, G. S.; LAMBEAU, G.; GIARDINA, C.; ROSEMBERG, D. W. Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 307-315, 2003

DORSHKIND, K.; LANDRETH K.S. Regulation of B cell differentiation by bone marrow stromal cells. **International Journal of Cell Cloning**, v. 10, n. 1, p. 12–17, 1992.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. **Annual Review of Immunology**. v. 27, p. 83-117, 2009.

EZEH, U. I.; TUREK, P. J.; REIJO, R. A. CLARK, A.T. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. **Cancer**, v. 104, p. 2255–2265, 2005.

FARROW, B.; EVERS, B. M. Inflammation and the development of pancreatic cancer. **Surgery Oncology**, v. 10, p.153–69, 2002.

FARROW, B.; SUGIYAMA, Y.; CHEN, A.; UFFORT, E.; NEALON, W.; MARK EVERS, B. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. **Annals Surgery**, v. 239, p. 763–769, 2004.

FELICIANO, M.A.R.; JOÃO, C.F.; CARDILLI, D.J.; CRIVELARO, R.M.; VICENTE, W. R. R. Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX , n. 1, 2012.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 131, p.64-67, 2003.

FILDER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revised. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, p. 453-8, 2003.

FITZGIBBONS P. L. Prognostic factors in breast cancer College of American Pathologists Consensus Statement, 1999. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 124, p. 966-978, 2000.

FODOR, W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reproduce Biology Endocrinology**, v.1, p. 102, 2003.

GABELLINI, C.; TRISCIUOGLIO, D.; DESIDERI, M.; CANDILORO, A.; RAGAZZONI, Y.; ORLANDI, A.; ZUPI, G.; DEL BUFALO, D. Functional activity of CXCL8 receptors, CXCR1 and CXCR2, on human malignant melanoma progression. **Europe Journal. Cancer**, v. 45, n. 14, p. 2618–2627, 2009.

GARCIA-VILLALBA, P.; JIMENEZ-LARA, A. M.; ARANDA, A. Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. **Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 318–27, 1996.

GARDEREN, E. V.; DE WIT, M.; VOORHOUT, W. F.; RUTTEMAN, G. R.; MOL, J. A.; NEDERBRAGT, H.; MISDORP, W. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. **American Journal of Pathology**, v. 150, n.3, p. 345-352, 1997.

GERALDES, M.; GÄRTNER, F.; SCHMITT, F.N. An immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumors. **Veterinary Record**, v.146, p.403-406, 2000.

GLAIRE, M. A.; EL-OMAR, E. M.; WANG, T. C.; WORTHLEY, D. L. The mesenchyme in malignancy: A partner in the initiation, progression and dissemination of cancer. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, p. 131–141. 2012.

GLENNIE, S.; SOEIRO, I.; DYSON, P. J.; LAM, E. W.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**, v. 105, p. 2821–2827, 2005.

GOMES, F. R. Marcadores tumorais (alcances e limites). **Acta Medina Portuguesa**. v.10, n.1, p.75-80, 1997.

GORDON S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GUSTERSON, B.; ROSS, D. T.; HEATH, V. J.; STEIN, T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 4, p. 143-148, 2005.

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

HARRELL, J.C.; DYE, W.W.; ALLRED, D.C.; JEDLICKA, P.; SPOELSTRA, N.S.; SARTORIUS, C.A.; AND HORWITZ, K.B. Estrogen Receptor Positive Breast Cancer

Metastasis: Altered Hormonal Sensitivity and Tumor Aggressiveness in Lymphatic Vessels and Lymph Nodes. **Cancer Research**, v.66, n.18, p. 15- 21, 2006.

HARVEY, J. Glândulas mamárias. In: BOJRAR, M. J., **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1996. cap. 35, 425-429 p.

HEDLUND, C. S. Cirurgia dos Sistemas Reprodutivos e Genital. In: Fossum, T.W.; **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Rocca Ltda, 2002. 571-637 p.

HELLEMANS, P.; VAN DAM, P. A.; WEYLER, J.; VAN OOSTEROM, A. T.; BUYTAERT, P.; VAN MARCK, E. Prognostic value of bcl-2 expression in invasive breast cancer. **Brazilian Journal Cancer**, v. 72, p.354–360, 1995.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMID, T. M. H.; HOLT, D. E.; SHOFER, F. S.; SMITH, A.; SORENMO, K. U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 776-780, 2005.

HOLDAWAY, I. M.; MASON, B. H. ; LETHABY, A. E.;SINGH, V.; HARVEY, V. J.; THOMPSON, P. I.; EVANS, B. D. Serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 following chemotherapy for advanced breast cancer. **ANZ Journal Surgery**, v.73, p. 905-908, 2003.

HOON, D. S.; SARANTOU, T.; DOI, F.; CHI, D. D.; KUO, C.; CONRAD, A. J.; SCHMID, P.; TURNER, R.; GUILIANO, A. Detection of metastatic breast cancer by beta-hCG polymerase chain reaction. **International Journal Cancer**, v. 21, n.5, p. 369-374, 1996.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERB-B receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nature Review Cancer**, v. 5, n.5, p. 341-354, 2005.

INOUE, D. P.; AMAR, A.; CERVANTES, O. Marcadores tumorais no câncer da laringe. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 34, n.1, p. 36-42, 2005.

JENKINS, P. J.; MUKHERJEET, A.; SHALET, S. M. Does growth hormone cause cancer? **Clinical Endocrinology**. 2006; v. 64, p. 115-121.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, v. 39, p. 295–312, 1999.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. In: **Patologia Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. 1213-1222 p.

KAMOHARA, H.; TAKAHASHI, M.; ISHIKO, T.; OGAWA, M.; BABA, H. Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor- α and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. **International Journal Oncology**, v. 31, p. 627–632, 2007;

KHANDWALA, H. M.; MCCUTCHEON, I. E.; FLYVBJERG, A.; FRIEND, K. E. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 3, p.215–244, 2000.

KILVAER, T. K.; VALKOV, A.; SORBYE, S.; SMELAND, E.; BREMNES, R. M.; BUSUND, L. T.; DONNEM, T. Profiling of VEGFs and VEGFRs as Prognostic Factors in Soft Tissue Sarcoma: VEGFR-3 Is an Independent Predictor of Poor Prognosis. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p.15368, 2010.

KIM, J. S.; CHAE, H. D.; JOH, T. H.; KIM, K. T. Stimulation of human DBH gene expression by prostaglandin E2 in human neuroblastoma SK-N-BE (2) C cells. **Journal Molecular Neuroscience**, v. 9, p. 143-150, 1997.

KIRKIN, A. F.; DZHANDZHUGAZYAN, K.; ZEUTHEN, J. Melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 106, p. 665-679, 1998.

Kishimoto T¹. IL-6: from its discovery to clinical applications. **Int Immunol**. 2010 May;22(5):347-52.

KLINGBEIL, P.; NATRAJAN, R.;EVERITT, G.; VATCHEVA, R.; MARCHIO, C.;PALACIOS, J.;BUERGER, H.;REIS-FILHO, J.S.;ISACKE, C.M. CD44 is over expressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. **Breast Cancer Research and Treatment**, p. 95-109, 2009.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KRAUS, V. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of arthritis. **Foot and Ankle Clinics**, v. 8, p. 187-200, 2003.

KUMAR, S.; CHANDA, D.; PONNAZHAGAN, S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. **Gene Therapy**, v. 75, p. 711–715, 2008.

LADSTEIN, R. G.; BACHMANN, I. M.; STRAUME, O.; AKSLEN, L. A. Research article Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. **BMC Cancer**, v. 10, p. 140, 2010.

LANG, K.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K. S.; ENTSCHLADEN, F. Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop. **International Journal Cancer**, v. 99, p. 673–80, 2002.

LARSEN, C. G.; ANDERSON, A. O.; OPPENHEIM, J. J.; MATSUSHIMA, K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. **Immunology**, v. 68, n. 1, p. 31–36, 1989.

LE BLANC, K.; TAMMIK, L.; SUNDBERG, B.; HAYNESWORTH, S. E.; RINGDEN, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, p. 11-20, 2003.

LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.

LI A, DUBEY S, VARNEY ML, DAVE BJ, SINGH RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **Journal Immunology**, v. 170, p.3369–3376, 2003

LI, W.; MAO, Z.; FAN, X.; CUI, L.; WANG,X. Cyclooxygenase 2 promoted the tumorigenicity of pancreatic cancer cells. **Tumors Biology**, v. 35, p. 2271–2278, 2013.

LIN, E. Y.; NGUYEN, A.V.; RUSSELL, R. G.; POLLARD, J. W. Colony-17. stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *Journal Experimental Medicine*, v.193, n. 6, p.727-40, 2001.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 1175–1183, 2007.

LIU, H.; KEMENY, D. M.; HENG, B. C.; OUYANG, H. W.; MELENDEZ, A. J.; CAO, T. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 2864–2871, 2006.

LOEBINGER, M. R.; EDDAOUDI, A.; DAVIES, D.; JANES, S. M. American Association for Cancer Research Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate. **Metastatic Cancer**, v.12, p. 4134–4142, 2009.

LOOI, L.M.; CHEAH, P.L.; ZHAO, W.; NG, M.H.; YIP, C.H. CD44 expression and axillary lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma of the breast. **Malaysian Journal Pathology**, v. 28, n. 2, p. 83086, 2006

LOWE, S.; JACKS, T.; HOUSMAN, D.; RULEY, H. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of American**, v. 91, p. 2026–2030, 1994.

LOWE, L. C.; GUY, M.; MANSI, J. L.; PECKITT, C.; BLISS, J.; WILSON, R. G.; COLSTON, K. W. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. **Europe Journal Cancer**, v. 41, p. 1164–1169, 2005.

MACAW, D. L. Moléstias da glândula mamária. In: BOJRAB, M. J.; SMEAK, D.D. **Mecanismos da moléstia na cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. Cap.29, p. 216-219.

MACEWEN, E.G.; WITHROW, S. J. **Small animal clinical oncology**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996.p. 4-16.

MACGROGAN, G.; SOUBEYRAN, I.; DE MASCAREL, I.; COINDRE, J. M. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in breast invasive ductal carcinomas: a correlative study of 942 cases. **Application Immunohistochemical**, v. 4, p. 219-227, 1996.

MAJUMDAR, M. K.; THIEDE, M. A.; HAYNESWORTH, S. E.; BRUDER, S. P.; GERSON, S. L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (CTMs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. **Journal Hematotherapy Stem Cell Research**, v. 9, p. 841-848, 2000.

MARTINS, D.C.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Science. Veterinary.**, v. 31, p.189-191, 2003.

MCENTEE, M. F.; CATES, J. M.; NEILSEN, N. Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. **Veterinary Pathology**, v. 39, p.428-436, 2002.

MIALOT, J. P.; LAGNEAU, F.; PARODI, A. L.; ANDRÉ, F. Tumores mamários na cadela. **A Hora Veterinária**, n. 2, p. 33- 39, 1981.

MICHAEL, B.; LEE, M.; NISHIZAKI, M.; TOSHIYOSHI, F.; WENBIAO, L.; CORAZÁ, N. D.; BINGLIANG, F.; JACK, L.; JACK, A. Roth2 Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. **Cancer Research**, v. 58, p. 2288-2292, 1998.

MILLANTA, F.; LAZZERI, G.; MAZZEI, M.; VANNOZZI, I.; POLI, A. MIB-1 labeling index in feline dysplastic and neoplastic mammary lesions and its relationship with postsurgical prognosis. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 120-126, 2002.

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

MOL, J. A.; VAN GARDEREN, E.; SELMAN, P. J.; WOLFSWINKEL, J.; RIJNBEEK, A.; RUTTEMAN, G. R. Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. **Journal Clinical Investigation**, v. 95, p. 2028-2034, 1995.

MOLINA, R.; BARAK, V.; VAN DALEN, A.; DUFFY, M.J.; EINARSSON, R.; GION, M.; GOIKE, H.; LAMERZ, R.; NAP, M.; SÖLÉTORMOS, G.; STIEBER, P. Tumor markers in breast cancer- European Group on Tumor Markers recommendations. **Tumor Biology**, v. 26, n. 6,p. 281-293, 2005.

MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REGIER, M. K.; OTTO, J. C.; HORI, T.; DEWITT, D.; L.; SMITH, W.; L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p.10902-10908, 1995.

MUMM, J. B.; OFT, M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene**, v. 27, p. 5913-5919, 2008.

NAKA, T.; SUGAMURA, K.; HYLANDER, B. L.; WIDMERMB, P.; RUSTUM, Y. M.; REPASKY, E. A. Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients' colon tumors grown in SCID mice. **Cancer Research**, v.62, p. 5800–5806, 2002.

NAOR, D.; SIONOV, R. V.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. **Advances in Cancer Research**, v. 71, p. 241-319, 1997.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios da vagina e do útero. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 57, p. 680-681.

NERURKAR, V. R.; SESHADRI, R.; MULHERKAR, R.; ISHWAD, C. S.; LALITHA, V. S.; NAIK, S. N. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. **International Journal Cancer**, v. 40, p. 230-232, 1987.

NIETO, A.; PENA, L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SÁNCHEZ, M. A.; FLORES, J.M.; CASTAÑO, M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. **Veterinary Pathology**, v.37, p. 239-247, 2000.

NOSSOV, V.; AMNEUS, M.; SU, F.; LANG, J.; JANCO, J. M.; REDDY, S.T.; FARIAS-EISNER, R.. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics Can we really do better than serum CA-125? **America Journal Obstetric Gynecology**, v. 199, n. 3, p. 215–223, 2008.

NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clinical Technical Small Animals Practice**, v.18, n.2, p.107-109, 2003.

O'REILLY, S. M.; RICHARDS, M. A: Clinical aspects of assessing cell proliferation. In: **Assessment of cell proliferation in clinical practice**. New York:Springer-Verlag, 1992.p. 63-79.

OHASHI, E.; MIYAJIMA, N.; NAKAGAWA, T.; TAKAHASHI, T.; KAGECHIKA, H.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n. 8, p. 797-802, 2006.

OOSTERLAKEN-DIJKSTERHUIS, M. A.; KWANR, M. M.; SLOB, A.; HELLMEN, E.; MOL, J. A. IGF-1 and retinoic acid regulate the distribution pattern of IGFBPs synthesized by the canine mammary tumor cell line CMT-U335. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 59, p. 11-23, 1999.

OSIN, P. P.; LAKHANI, S. R. The pathology of familial breast cancer: Immunohistochemistry and molecular analysis. **Breast Cancer Research**, v. 1, n. 1, p. 36-40, 1999.

PANG, L.Y.; ARGYLE, D. Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology. **The Veterinary Journal**, 185:15-22, 2010.

PARK, B.W.; OH, J. W.; KIM, J. H.; PARK, S. H.; KIM, K. S.; KIM, J. H.; LEE, K. S. Preoperative Ca15-3 and CEA serum levels as predictor for breast cancer outcomes. **Journal of Oncology**, v. 19, n. 4, p. 675-681, 2008.

PESCE, M.; SCHOLER, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, v. 19, p. 271–278, 2001.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, p.10-34, 1994.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 237–246, 1998.

PITTENGER, M.F.; MARTIN, B.J. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v. 9, n.5, p. 9-20, 2004.

POETA, M. L.; MANOLA, J.; GOLDWASSER, M. A.; FORASTIERE, A.; BENOIT, N.; CALIFANO, J. A.; RIDGE, J. A.; GOODWIN, J.; KENADY, D.; SAUNDERS, J.; WESTRA, W.; SIDRANSKY, D.; KOCH, W. M. “TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck,” **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 25, p. 2552–2561, 2007.

POLYAK, K.; WEINBERG, R. A: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 265-273, 2009,.

POZDNYAKOVA, O.; HOANG, M.; DRESSER, K.; MAHALINGAM, M. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, CD44v6, and HER2/neu in 55 metastatic cutaneous adenocarcinoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medical**, v. 133, n. 8, p.1285-90, 2009.

PRADEEP, A. R.; ANUJ, S.; RAJU, P. A. Anemia of chronic disease and chronic periodontitis: does periodontal therapy have an effect on anemic status? **Journal Periodontal**, v. 82, n. 3, p. 388-394, 2011

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p. 71-74, 1997.

REIHS AUS, E.; KOHLER, M.; KRAISS S.; OREN, M.; MONTENARH, M. Regulation of the level of the oncoprotein p53 in non-transformed and transformed cells. **Oncogene**, v.5, n. 1, p. 137-45, 1990.

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

RISTIMAK, I. A.; NIEMINEN, O.; SAUKKONEN, K.; HOTAKAINEN, K.; NORDLING, S.; HAGLUND, C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **American Journal Pathology**, v.158, p. 849–853, 2001.

RIJNBERK, A.; MOL, J.A. Progesterin-induced hypersecretion of growth hormone: an introductory review. **Journal Reproduce Fertile Supplement**,v.51, p. 335-338, 1997.

RODDA, D. J.; CHEW, J. L.; LIM, L. H.; LOH, Y. H.; WANG, B.. NG, H.H.. ROBSON, P. Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. **Journal Biologic Chemical**, v. 280, p. 24731–24737, 2005.

ROSE-JOHN S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **International Journal Biologic Science**, v. 8, n. 9, p.1237-47, 2012.

RUDAS, M.; NEUMAYER, R.; GNANT, M. F. X.; MITTELBCICK, M.; JAKESZ, R.;REINER, A. 53 Protein Hormone Expression, Cell Proliferation and Steroid Receptors in Ductal and Lobular In Situ Carcinomas of the Breast. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 1, p. 39-44, 1997.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 100, p. 497–512, 1980.

RUSSO, J.; MAILLO, D.; HU, Y.F.; BALOGH, G.; SHERIFF, F.; RUSSO, I. H. Breast differentiation and its implication in cancer prevention. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 931S–936S, 2005.

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**. 2.ed. Philadelphia : Sanders, 2001. p. 455-477.

RUTTEMAN, G. R.; KIRPENSTEIJN, J. Tumors of Mammary Glands. **In Manual of Canine and Feline Oncology**. 2. ed. Gloucester: BVA, 2003. 234 – 239 p.

SCHOPPMANN S. F., BIRNER, P., STOCKL, J.; KALT, R.; ULLRICH, R.; CAUCIG, C.; KRIEHLER, E.; NAGY, K.; ALITALO, K.; KERJASCHKI, D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and related to peritumoral lymphangiogenesis. **American Journal Pathology**, v. 161, p. 947-956, 2002,

SALCEDO, R.; PONCE, M. L.; YOUNG, H. A. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. **Blood**, v. 96: p. 34–40, 2000.

SPAGGIARI, G. M.; CAPOBIANCO, A.; BECCHETTI, S.; MINGARI, M. C.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing CTMs, whereas CTMs can inhibit IL-2 induced NK-cell proliferation. **Blood**, v. 107, n. 4, p. 1484-1490, 2006.

SARTIN, E. A.; BARNES, S.; KWAPIEN, P.; WOLFE, L. G. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 11, p. 2196-2200, 1992.

SASSER, A. K.; MUNDY, B. L.; SMITH, K. M.; STUDEBAKER, A. W.; AXEL, A. E.; HAIDET, A. M. Human bone marrow stromal cells enhance breast cancer cell growth rates in a cell line-dependent manner when evaluated in 3D tumor environments. **Cancer Letter**, v. 254, p. 255–264, 2007a.

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

SCHWARTZ, M. Specialized techniques of cancer management and diagnosis. Section 3. Cancer markers. In: DeVita V, Hellman SJR, Rosenberg S. **Cancer: Principles & practice of oncology**. Philadelphia: JB Lippincott, 1993. 531-542 p.

SELMAN, P. J.; MOL, J. A.; RUTTEMAN, G. R.; VAN GARDEREN, E.; RIJNBERK, A. Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. **Endocrinology**, v. 134, p. 287-292, 1994.

SERGINA, N. V.; RAUSCH, M.; WANG, D.; BLAIR, J.; HANN, B.; SHOKAT, K. M.; MOASSER, M. M. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. **Nature**, v. 445, p. 437-441, 2007.

SHURIN, M. R.; SALTER, R.D. **Dendritic cells in Cancer**. 1. ed. New York: Springer, 2009. 345p.

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

SINGER, C.; RASMUSSEN, A.; SMITH, H. S.; LIPPMAN, M. E.; LYNCH, H. T.; CULLEN, K. J. Malignant breast epithelium selects for insulin-like growth factor II expression in breast stroma: evidence for paracrine function. **Cancer Research**, v. 55, p. 2448–2454, 1995.

SMALLEY, K. S.; CONTRACTOR, R.; HAASS, N. K.; KULP, A. N.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E.; WILLIAMS, D.S.; BREGMAN, H.; FLAHERTY, K. T.; SOENGAS, M. S.; MEGGERS, E.; HERLYN, M. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. **Cancer Research**, v. 67, p. 209–217, 2007.

SOHARA, Y.; SHIMADA, H.; MINKIN, C.; ERDREICH-EPSTEIN, A.; NOLTA, J. A.; DECLERCK, Y. A. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and destruction by cancer cells. **Cancer Research**, v. 65, p. 1129-1135, 2005.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinical North America Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573-96, 2003.

SORENMO, K.U.; RASOTTO, R.; ZUPPULLI, V.; GOLDSCHMIDT, M.H. Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.48, n. 1, p.85-97, 2011.

SPYCHALA, J.; LAZAROWSKI, E.; OSTAPKOWICZ, A.; AYSCUE, L. H.; JIN, A.; MITCHELL, B. S. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 708–717, 2004.

STAGG, J.; DIVISEKERA, U.; DURET, H.; SPARWASSER, T.; TENG, M.W.L.; DARCY, P. K.; SMYTH, M. J. CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis. **Cancer Research**, v. 71, n. 8, p.15-22, 2011.

STERNLICHT, M. D.; KEDESHIAN, P.; SHAO, Z. M.; SAFARIANS, S.; BARSKY, S. H. The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. **Clinical Cancer Research**, v.3, p. 1949- 1958, 1997.

STILLIE, R.; FAROOQ, S. M.; GORDON, J. R.; STADNYK, A. W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 3, p. 529–543, 2009.

STRANDBERG, J.D.; GOODMAN, D.G. Animal model of breast cancer. **American Journal of Pathology**, v.75, n. 1, p. 225-228. 1974.

STRANSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v.69, p. 207, 2000.

SURH, Y.J.; CHUN, K.S.; CHA, H.H.; HAN, S.S.; KEUM, Y.S.; PARK, K.K.; LEE, S.S. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. **Mutation Research**, v. 480-481, p.243–268, 2001.

TAKAMORI, H.; OADES, Z. G.; HOCH, O. C.; BURGER, M.; SCHRAUFSTATTER, I. U. Autocrine growth effect of IL-8 and GRO α on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. **Pancreas**, v. 21, n. 52–6, 2000.

TANEJA, P.; MAGLIC, D.; KAI, F. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. **Clinical Medicine Insights Oncology**, v. 4, p. 15-34, 2010.

THURÓCZY, J.; REISVAAG, G. J. K.; PERGE, E.; TIBOLD, A.; SZILÁGYI, J.; BALOGH, L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v.137, p. 122-129, 2007.

TSUJII, M.; DUBOIS, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v.83, p.493–501, 1995.

TOUITOU Y, BOGDAN A. Tumor markers in non-malignant diseases. **Europe Journal Cancer Clinical Oncology**, v. 24, p.1083-1091, 1988

UCCELLI, A.; PISTOIA, V.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? **Trends in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 219–226, 2007.

UCHIYAMA, H.; BARUT, B. A.; CHAUHAN, D.; CANNISTRA, S. A.; ANDERSON, K. C. Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. **Blood**, v. 80, p. 2306–2314, 1992.

UCUR, E.; MATTERN, J.; WENGER, T.; OKOUOYO, S.; SCHROTH, A.; DEBATIN, K. M.; HERR, I. Induction of apoptosis in experimental human B cell lymphomas by conditional TRAIL-expressing T cells. **Brazilian Journal Cancer**, v. 89, p. 2155–2162. 2003.

VAN GARDEREN, E.; DE WIT, M.; VOORHOUT, W. F.; RUTTEMAN, G. R.; MOL, J. A.; NEDERBRAGT, H.; MISDORP, W. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. **America Journal Pathology**, v. 150, p. 1037-1047, 1997.

VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J. A. Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. **Molecular Cell Endocrinology**, v.197, p.153-165, 2002.

XIE, K. Interleukin-8 and human cancer biology. **Cytokine Growth Factor Review**. v. 12, n. 4, p. 375–391, 2001.

WANG, L. L. R.; LI, W.; CHEN, C. H.; KATOH, H.; CHEN, G. Y.; MCNALLY, B.; LIN, L.; ZHOU, P.; ZUO, T.; COONEY, K. A.; LIU, Y.; ZHENG, P. Somatic single hits inactivate the x-linked tumor suppressor foxp3 in the prostate. **Cancer Cell**, v.16, p. 336-346, 2009.

WANG, G. X.; ZHAN, Y. A.; HU, H. L.; WANG, Y.; FU, B. Mesenchymal stem cells modified to express interferon- β inhibit the growth of prostate cancer in a mouse model. **The Journal of International Medical Research**, v. 40, p. 317–327, 2012.

WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical. Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6735–6741, 2008.

WELCH, P. A.; BURROWS, P. D.; NAMEN, A.; GILLIS, V.; COOPER, M. D. Bone marrow stromal cells and interleukin-7 induce coordinate expression of the BP-1/6C3 antigen and pre-B cell growth. **International Immunology**, v. 2, n. 8, p. 697–705, 1990.

WINTZER, H. O.; ZIPFEL, I.; SCHULTE-MONTING, J.; HELLERICH, U.; VON KLEIST, S. Ki67 immunostaining in human tumours and its relationship to prognosis. **Cancer**, v. 67, p. 421-428, 1991.

WU, D.; MOLOFSKY, A. B.; LIANG, H. E.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; JOUIHAN, H. A.; BANDO, J. K.; CHAWLA, A.; LOCKSLEY, R. M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 32, p. 243-247, 2011.

YAO, C.; LIN, Y.; CHUA, M. S.; YE, C. S.; BI, J.; LI, W.; ZHU, Y. F.; WANG, S. M. Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. **International Journal Cancer**, v. 121, p. 1949-1957, 2007.

YIN, J. J.; POLLOCK, C. B.; KELLY, K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 57-62, 2005

YONEDA, T.; HIRAGA, T. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 3, p. 679-87, 2005.

ZENG, G. MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4⁺ T cells: new strategies for cancer vaccine design. **Journal of Immunotherapy**, v. 24, p. 195-204, 2001.

ZHA, S.; GAGE, W. R.; SAUVAGEOT, J.; SARIA, E. A.; PUTZI, M. J.; EWING, C. M.; FAITH, D. A.; NELSON, W. G.; DEMARZO, A. M.; ISAACS, W. B. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. **Cancer Research**, v. 61, p. 8617-8623, 2001.

Correlation of histological analysis prognostics and progression the canine mammary tumors

S. E. A. Will^{1,2}, P. O. Favaron¹, J. A. L. Moreira², R. E. G. Rici¹ and D. A. Maria²

¹ Department of Surgery, Faculty of the Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Laboratory of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute, 1500, Av. Vital Brasil, Butantan, Zip Code 05503-900 São Paulo, Brazil

The breast tumor is in female dogs having a high rate of mortality, having a high biological heterogeneity and 50% are malignant. Identifying the origins of the various cellular elements that make up tumors as well the factors that contribute to malignant transformation are important for understanding the behavior and evolution of these tumors. For the characterization of breast tumors canine, were performed inverted microscopy techniques for cell culture, transmission and scanning electronic microscopy confocal scanning and immunocytochemistry with markers stem cones cells and proliferation rate. Tumors with higher significantly degree of invasiveness showed higher expression of markers involved in angiogenesis and tumorigenesis such as COX-2 and VEGF receptor.

Keywords: breast tumor; angiogenesis; collagen; stem cell cancer; cytoesqueleted

1. Introduction

The mammary gland tumors are very heterogeneous in terms of morphology and biological behavior [1]. Based on the histological and biological criteria, which can be estimated that about almost half of surgically removed breast tumors are malignant [2]. The tumors are characterized by a complex morphology consisting of two basic elements: the first is the parenchyma result of presence of epithelial and mesenchymal cells in close association, which puts into question its histogenesis. The second element corresponds to the stromal fibrovascular nature of fibrous appearance, cartilage or bone [3], which provides the supporting structure for growth and necessary for the maintenance of the neoplastic cells nutrients. The stroma is an extension of the adjacent normal tissue is stimulated to grow and proliferate in the tumor by the action of factors secreted by tumors cells [4]. All two cell types may exist in benign and malignant tumors. The interaction with parenchymal stromal in this microenvironment, is the beginning of the carcinogenesis process [1]. Light microscopy is one of the most used techniques for diagnosis of various diseases. A differential technique widely used in anatomic-pathologic routine is immunohistochemistry, which requires a large panel of specific markers used in tumors that can be difficult to diagnose and inappropriate treatment. Immunostaining is also used for identification and localization of proteins. For immunohistochemistry may be characterized tumor cell components and their histogenesis using monoclonal antibodies specific to cell differentiation in breast cancer [5].

The transmission electron microscopy (TEM) has been used in specific selected cases where additional information is required for more proper classification with higher accuracy of prognosis and treatment, adds relevant information in some studies, for example, cell-cell interactions (such as the interaction of tumor cells with the endothelium, and also analyzed more accurately using scanning electronic microscopy SEM [6].

Identifying the origins of the various cellular elements that make up tumors as well the factors that contribute to malignant transformation are important for understanding the behavior and evolution of these tumors, however are aspects that remain to be elucidated. Some molecular factors with potential prognostic value in canine breast cancer led to the identification of new prognostic factors.

2. Materials and Methods

Samples of canine mammary tumors were collected of 38 dogs with a minimum age of 6 ± 2 years obtained from the routine of the Veterinary Hospital of in the city of São Paulo. The samples were divided into two groups: samples for histological analysis were fixed in 10% buffered formalin, how the samples were stored in cell culture medium with High DMEH.

2.1 Histology

The project was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Brazil (No. 2455/2011). Sample longitudinal of the tumor was selected from each group, processed for paraffin, sectioned (3 μ M) and stained with hematoxylin-eosin for light microscopy using a microscope Axiostar (Carl Zeiss Brazil Ltda.). Anatomy pathology diagnostic were released by veterinary pathologists at the Laboratory of Pathology, of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo. The criteria used for the lesions followed those proposed by Misdorp et al (1999) [7], and was divided into three groups: Tubulopapillary carcinomas, adenocarcinoma complex and simple adenoma.

2.1.1 Collagen Special Stain (Masson's Trichrome Staining)

Tumors tissue slides were placed in staining and deparaffinised by submerging into three series of absolute xylene for 4 min. each followed by 100-95-90-80-70% of ethanol for 4 min. in each percentage. The slides then were submerged in warmed Bouin's solution at 60°C for 45 min., and washed in running tap water until yellow color in samples disappeared. To differentiate nuclei, slides then were immersed in modified Weigert's haematoxylin for 8 min., after that washed in running water for 2 min. In order to stain cytoplasm and erythrocytes, slides were submerged in anionic dyes, acid fuchsin (C.I. 42590, Merck, Germany) for 5 min.; then again slides were washed with running tap water for 2 minutes. Next, slides were treated with phosphomolybdic acid solution for another 10 minutes as a mordant and immediately slides were submerged into methyl blue (C.I. 42780, Merck, Germany) solution for 5 min. in order to stain fibroblast and collagen. After that, slides were washed in running water for 2 minutes and lastly treated with 1% acetic acid solution for 1 min. Slides then were dehydrated into a series of alcohol of 70- 80-95-100% for 1 min. Before observation, slides were dipped into absolute xylene for 1 min. and finally mounted with cover slip using DPX mounting.

2.1.2 Immunohistochemical study

An immunohistochemical study by streptavidin -biotin technique was performed using antibodies against vimentin. The clone V9 of antibodies used in the antigen retrieval in 1:50 dilution, incubation time 120s. All the selected material was fixed in formaldehyde and embedded in paraffin, histological sections of 3µm and placed on slides being made based adhesive containing 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The sections were dewaxed in xylene, rehydrated in an alcohol sequence to the water and washed in two distilled water for 5 min each. Blocking endogenous peroxidase with hydrogen peroxide 20vol washed in water and incubated in Tris-HCl (Tris- hydroxymethyl aminomethane), pH 7.4 for 10 min was done. The sections were incubated with anti-mouse monoclonal antibody, diluted in buffer Tris-HCl, streptavidin to incubation with biotin - complex in a 1:100 dilution for 30 min. For development diaminobenzidine chromogen solution 0.03%, diluted in TRIS - HCL added to 0.6 ml of hydrogen peroxide 20vol dark chamber for 3 min and counterstaining as the Mayer Hematoxylin was used for 10 min, washing in water after each step. Finalizing the process became alcohol for dehydration and leaf clearing in xylene for mounting the cover slip with Permount. The analysis of immune was performed by two examiners at different times, in a double-blind study by light microscopy, were considered positive all cells that exhibited morrom staining in their cytoplasm. Thus, we investigated the presence or absence of markup, assigning the following scores: - (no marker); + (Focal marker, less than 10% of cells stained) and ++ (diffuse labeling).

2.2 Collecting, cell culture and cell morphology

The fragments of tumor were processed by removing the bleeding tissue. The sample was macerated with a scalpel into small pieces of 0.01 cm² and adhered to petri dishes for 1 hour in fetal bovine serum in the culture oven at 37°C and 5% CO². The initial cultures were maintained in culture bottles of 25cm² in cell culture medium of DMEM-H (LGC Biotechnology – São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (Vitrocell, Edinburgh, Scotland, UK), 1% penicillin and streptomycin, 1% pyruvic acid (Gibco®, Carlsbad, CA, USA), pH = 7.4 at 37 ° with 5% CO² humidified incubator. Cells were grown in monolayer adhered to the surface of the culture dish. The subculture cells were usually obtained made from confluent cells about 3 days and expanded after trypsinization with a solution of 0.25% trypsin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) of cells in the monolayer. Tumoral cells were analyzed morphologically each 3 days using inverted microscopy. The culture cells in Petri dishes over coverslips and fixed in paraphormol 4 % for 2h and stained with hematoxylin/ eosin, photographed in inverted microscopy linked to CCD-Sony image capture system.

2.2.1 Transmission Electron Microscopy (TEM)

After 24 hs of cultivation, the cells were trypsinized, centrifuged, the pellet was washed and fixed in 2% glutaraldehyde (pH 7.3) overnight at 4°C. After fixation, the samples were washed with the same buffer, embedded in the melted 2% agar (Merck, Darmstadt, Germany), postfixed and buffered in phosphate osmium tetroxide and 1.5% potassium ferricyanide for 1 h before dehydration in a graded ethanol series and infiltration and embedding a sequence of propylene Epon (PolyBed 812, Polysciences, Warrington, PA, USA) oxide. Thin sections were cut with a diamond knife on an ultramicrotome (Sorvall MT2, Newton, MA, USA) and mounted on copper grids coated 200 mesh (Ted Pella, Redding, CA) before staining with uranyl acetate and lead citrate. The samples were viewed using a transmission electron microscope (TEM) (10, Zeiss, Germany) at 60 kV.

2.2.2 Fluorescence Immunophenotyping

The tumors cells (10^4) were grown on coverslips in a culture. After 48 hs, the cells were washed twice in Tris buffered saline (20 mM Tris - HCl pH 7.4 at 0.15 M NaCl and 0.05% Tween - 20) and fixed for 24 hs 4% paraformaldehyde followed by permeabilization with 0.1% Triton X -100 (Sigma, St. Louis, Missouri USA). After blocking with 5% bovine serum albumin, the cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies bovine serum albumin. The primary antibodies were vimentin (0.N.602, sc-73259, Santa Cruz Biotechnology), and β -tubulin (2146, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). After washing three times of primary antibody in Tris-buffered saline, the secondary antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate and incubated at room temperature for 1 hs. The secondary antibodies were anti-goat IgG, anti-rabbit IgG (DakoCytomation, CA, USA). The slides were mounted with Vectashield with DAPI (C-1200, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Digital blades were obtained using a fluorescence microscope LSM 510 META (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), laser excitation with 488 nm and emission filter BP 500-550 nm. For negative control, an IgG (Clone Ci4, Merck, Billerica, USA) was used to replace the primary antibody.

2.2.3 Scanning electron microscopy (SEM)

The cells were culture in Petri dishes of 3cm in diameter after 24 hs, fixed Fixation in Karnowsky (5% glutaraldehyde and 4% paraformoldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2); - Washing in sodium cacodylate pH 7.2 3 washes of 15 min. cap-Post-fixation with osmium tetroxide, 1% in 0.1 M cacodylate buffer; for 1 hs. - Washing in sodium cacodylate buffer pH 7.2 15 min. 3 washes-Wash with detergent (See heavy cleaning) followed by a series of four washings with distilled water in ultrasound. Dehydration in ascending series of ethanol up to 30% absolute ethanol; the dehydrated materials were critical point dried using and subsequently coated with a thin layer of gold. The fragments were analyzed in a high vacuum in the microscope FEI Quanta 250 Scanning.

2.3 Statistical Analyses

To compare three or more groups the data were analyzed by the variance method of ANOVA followed by multiple comparison Tukey-Kramer test using the Graph Prism Software. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) independent, considering as significant values * $p < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1 Histological Analysis

Among the tumors diagnosed as greater degrees of invasiveness was tubulopapillary carcinoma. The Masson Trichrome staining gave a general idea of the architecture of the tumor there was micro-environment. In micro tubulopapillary carcinoma blades there is great amount of collagen in the tumor, the tumor stroma is rich in collagen fibers that stain blue, differentiating between tumor cells in red it highlights areas in dark blue corresponding to fibrosis, far beyond what had been observed in HE stain. Tumors indicating that these areas are able to synthesize collagen, connective adopt the phenotype of cells, contains numerous collapsed alveolar structures and extensive periglandular fibrosis, therefore these cell assuming the role of fibroblast proliferation characterizing feature of self-cells of malignant tumors. (Fig. 1 A-C). In samples of adenocarcinoma complex observed lower concentration of collagen fibers with lighter features, collagen fibers are restricted to the periphery of the tumor area, many observe tubular formations with clear lumen, contains secretory hyperplastic epithelial cells and fibrosis adjacent to a secretory adenocarcinoma (Fig. 1 D-F). The simple adenoma shows tumor cells with lighter features, collagen fibers are not seen between tumor cells, confirming its low grade of malignancy (Fig. 1 G-I).

Fig. 1 Masson's trichrome-stained tumors sections from (A-C) Tubulopapillary carcinoma, (D-F) complex adenocarcinoma, (G-I) simple adenoma.

3.1.2 Immunoistochemical result

For association between clinicopathological parameter and expression of vimentin intermediate filament III. Histological grade of invasive carcinoma was found to correlate with vimentin expression, with higher vimentin immunoscores in grade III cancer. Vimentin immunopositivity was also significantly associated with high histological grade, high nuclear grade. Immunohistochemistry study showed the papillary ducts for vimentin positivity throughout the tumor stroma, embedded in a matrix of dense collagen (Fig. 2A-C). In the complex adenocarcinoma was positive for fibroblastic stroma (Fig. 2D-F), while the simple adenoma showed no reactivity for vimentin (Fig. 3G-H).

Fig. 2 Immunoreactivity for vimentin on tumors mammary (A-C) Tubulopapillary carcinoma, (D-F) complex adenocarcinoma, (G-I) simple adenoma.

3.2 Characterization of morphological aspects of tumor cells

The cells from the three strain duct papillary carcinoma (Fig. 3 A, D and G), complex adenocarcinoma (Fig. 3 B, E and H) and single adenoma (Fig. 3 C, F and I) stained with HE, are adhered to the bottom bottle and have a variable appearance with growth between monolayer and multilayer. Are giant cells with nuclei of large dimensions. The pleomorphic cell lines, some epithelial cells with a round morphology and other elongated with a spindle shape. It was also observed the formation of cellular extensions with many branches that almost form interconnections through long cytoplasmic bridges.

Fig. 3 Photomicrograph obtained using an inverted microscope, culture tumor cells. (A- D): cell pleomorphism, E and F: nuclear irregularity and cytoplasmic granulation; G and H cell aspect fibroblast-like and epithelial with cellular pleomorphism and black arrays of cell divisions (black arrows. Hematoxylin - eosin staining. (10X).

3.2.1 Evaluation ultra-structural morphology of cell lines of canine breast tumor

The analysis TEM by of the tumors tubulopapillary carcinoma showed cells the cytoplasmic membrane has regular microvilli and cellular polymorphism. The cells had atypical nuclei, and the nucleolus is clearly visible in most sections, with core gently contoured with the heterochromatin. The cells showed cytoplasmic projections in membranes and granules at various stages of maturation (Fig. 4 A-F).

Fig. 4 Electron photomicrograph of canine breast tumor cells. Tumor cells are observed protruding microvilli on the cell surface (red arrow), atypical nuclei and large bypassed by heterochromatin (black arrow).

The Golgi complex is composed of lamellae providing morphologically preserved tanks located in cis portion with respect to the core and adjacent to the endoplasmic reticulum (ER). The RE has varied structures, formed into long filaments, with flat tanks and carrying numerous ribosomes, mitochondria (Fig. 5 F-H and M).

Fig. 5 Organelles electron photomicrograph of canine breast tumor cells.) Note the presence of numerous mitochondria (M) distributed throughout the cytoplasm, endoplasmic reticulum (ER), Golgi complex (G), lysosomes (L), microtubules (T) have well defined morphology, vacuoles (V).

Analysis by SEM showed organization mass tumor obtained of tumor mammary canine culture. Between sides edges of the cells appear as a thin line composed of fused microvilli. Small uniform microvilli are found in intermediate cells. Ultrastructure examination shows differentiated epithelial cells that line the luminal space of which projection membrane microvilli (Fig. 6). These cells were connected to each other by junction complexes. Intracellular junction complexes are of considerable length in well-differentiated tumors (Fig. 6).

Fig. 6 Images of scanning electron microscopy of the tumor cell culture of tumor mammary canine. The cell tumor analyses show the dynamic interaction between a cell and environment, write arrays expression membrane and microvilli.

Through trials immunofluorescence COX -2 (nuclear transcription factor), CD44, and VEGF (pluripotency markers and angiogenesis expression. Positive results were observed in mammary tumor canine cells for OCT3/4, NANOG and vimentin (Fig.7) expression. The COX-2 immunostaining was observed in two ways simultaneously, in the perinuclear region and cytoplasmic region (Fig. 7A). Positive results in the cytoplasmic region of the tumor cells was observed by CD44 expression markers (Fig. 7B) . Positive results in the nuclear region tumor cells was observed by immunostaining of OCT 3/4 (Fig. 7C) and VEGF receptors (Fig. 7D).

Fig. 7 Photomicrographs of immunohistochemical to the Tubulopapillary carcinoma cells (A) immunopositive for COX-2, and perinuclear citoplasmatica positive staining, (B) expression CD44 (C) distribution OCT 3/4 and (D) VEGF ireceptor expression.

4. Discussion

Mammary tumors are among the most common tumors in the entire female dogs [8, 9]. Despite intense clinical and pathological investigation, little is known about the etiology and prognosis of these tumors. In this sense it becomes a priority to determine concise and additional prognostic factors that can function as an aid in identifying high-risk [10]. The proper processing of the sample, as well as the selection and configuration of microscope is needed to enable more accurate observation and easy. Staining is one of these techniques, information about the color and shape are obtained by analyses. Fluorescent dyes are mainly used the observation of object detecting fluorescence using the fluorescence emitted from the samples. Staining allows differentiation of objects and clearer observation. The appropriate color should be selected according to the characteristic method and observation of samples.

In the present study with regard to the relationship between collagen and stromal components in invasive tumor mammary, there were some changes in different histological grades tubulopapillary carcinoma carcinoma, adenocarcinoma complex and simple adenoma . In tubulopapillary carcinoma carcinoma tubule observed distinct collagen deposits spread throughout the stromal. This may be due to the deposition of collagen fibers which were as thick bands and compactly composed of fibers , this feature is consistent with the concept [11 12]. They stated that the thick fibers were type I collagen fibers and exhibited intense staining red color, while the complex features fixes adenocarcinoma of collagen fibrillar tumor cells but with less intensity , and adenoma showed no labeling of collagen [13]. Masson Trichrome stain is used to demonstrate connective tissue. It is helpful in evidencing little intercellular bridges carcinomas, sarcomas and carcinomas distinguish, fibrin interstitial, fibrous tissue, teratomas in general,

chondrosarcomas and osteogenic sarcomas [14]. Our studies confirmed that the duct papillary carcinomas of higher histological grade of malignancy invasiveness were those with the highest amount of collagen. Immunohistochemical analyzes have demonstrated that contact between tumor cells and fibrillar collagen type I [15]. It is also assumed that the extracellular matrix proteins such as laminin and type IV collagen, and tenascin deposition are related to invasiveness [16].

The expression of vimentin is an uncommon finding carcinoma invasive breast cancer and is associated with high tumor invasiveness [17-19]. Vimentin expression was interpreted by others as a sign of cells that are epithelial-mesenchymal transition, reflecting the final stage of tumor differentiation is generally associated with a high potential for tumor cell invasion. Results showed that the tumors expressed vimentin were immunopositive for the groups of tumors had higher histological grade of malignancy and papillary duct carcinoma grade III associated with for vimentin. At work Hemalatha et al., (2013) and Chen et al., (2008) [20,21] and described a positive relationship between the expression of vimentin in ductal breast carcinoma, and high-growth fraction of the tumor. Vimentin expression is potentially a predictor of aggressive behavior, and such carcinomas may benefit from early adjuvant therapy. Eighty-four breast malignancies were labeled with anti-vimentin antibodies. Vimentin immunoreactivity was also positively correlated with the histological grade of ductal carcinoma and inversely related to tumor estrogen receptor count carcinoma. Thus vimentin expression seems to be a strong indicator of poor prognosis in breast ductal carcinomas [22] (Domagala et al., 1990). In invasive ductal carcinoma, vimentin expression is associated with low estrogen receptor, low progesterone receptor, increased invasiveness of the basal membrane, and drug resistance. [23-25].

On ultrastructural examination of SEM and TEM showed well-differentiated tumor cells that line the luminal space of the expression membrane microvilli. These cells were linked by filaments on each other by junctional complexes. Intracellular junction complexes were considerable length in tumors with higher histologic grade of malignancy. Was observed in the study Strandberg and Goodmann (1979), Boston (1986) and Queiroga and Lope (1973) the majority of adenocarcinomas in this series were well differentiated. The electron microscopic examination was useful in this study to accurately identify the types of cells [26-28]. The nature of presence of spindle cells ultrastructure characteristics of combined epithelial and fibroblast cells led us to recognize the importance of participation of myoepithelial cells in tumors [29-30]. In some tumors, luminal epithelial cells exhibit well-formed junction complexes along with characteristics of secretory cells, such as prominent Golgi apparatus and Reticule endoplasmic, but very few desmosomes. Aloysius and Weinstein (1976) in dog adenocarcinomas described by that such junction complex represent bidirectional differentiation of tumor cells [31].

All line culture tumors cells markers expressed COX-2 coincides with the average of reported marker in a pool of other large studies [32-34]. However, our study also examined the expression of marker in tumors that shared pathways stem cells cancer origin OCT 3/4, VEGF receptor and CD44, which provides additional information about the pattern of marker expression in different stages of the disease.

5. Conclusion

Based on the histological and biological criteria's, mammary gland tumors are very heterogeneous in terms of morphology and biological behavior. Tumors of higher histologic grades showed higher expression of markers involved in angiogenesis and tumorigenesis, confirming their degree of malignancy. Signaling pathways and biological functions regulated by tumors stroma elements by interacting with the malignant cells may be involved in the development of metastasis.

Acknowledgements We thank Dr. Henrique Krambeck Rofatto from Laboratório de Parasitologia, for confocal laser scanning microscopy (FAPESP 00/11624-5), and Beatriz Mauricio Laboratório de Biologia Celular, for Scanning Electron Microscope FEI QUANTA 250, Instituto Butantan, imaging support.

Reference

- [1] Aiello BS, et al. Manual Merck de Veterinária. São Paulo: Roca, 2001; 8: 400-402.
- [2] Misdor PW. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. Tumors in Domestic Animals. Iowa: Editor Iowa State Press. 2002; 4: 575-606.
- [3] Peleteiro MC. Tumores mamários na cadela e na gata. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 1994; 89: 10-34.
- [4] Jones TC, Hunt RD, King NW. Distúrbios do crescimento: aplasia até neoplasia. In: Patologia Veterinária. 6. ed. São Paulo, Manole. 2000; 25: 1213 – 22.
- [5] Destexhe E, Lespagnard L, Degeyter M. et al Immunohistochemical identification of myoepithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumours. Journal of Comparative Pathology. 1993; 113: 205-216.
- [6] Offner FA, Wirtz HC, Schiefer J, Bigalke I, Klosterhalfen B, Bittinger F, Mittermayer C, Kirkpatrick CJ. Interaction of Human Malignant Melanoma (ST-ML-12) Tumor Spheroids with Endothelial Cell Monolayers. American Journal Pathology. 1992; 141:601-610.
- [7] Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat. 2nd Edn., Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, Washington, DC., ISBN: 1-881041-66-2, 1999.

- [8] Egenvall A, Bonnett BN, Öhagen P, Olson P, Hedhammar Å, Von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*. 2005; 69:109–127.
- [9] Okamura Y, Haraguchi T, Morimoto M, Okuda M, Une S, Nakaichi M, Taura Y. Expression of a Tumor-Associated Antigen, RCAS1, in Canine Mammary Tumors. *Journal Veterinary Medicine Science*. 2004; 66: 651-658.
- [10] Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal Veterinary Science*. 2004; 5: 63-69.
- [11] Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens TypeI, II and III by Sirius red and Polarization microscopy. *Archive Histology Jpn Journal*. 1978; 41: 267-74.
- [12] Montes GS, Krisztan RM, Shighihara KM et al. Histochemical and morphological characterization of reticular fibres, *Histochemistry*. 1980; 65: 131-41.
- [13] Aparna V, Charu S. Evaluation of collagen in different grades of oral squamous cell carcinoma by using the Picrosirius red stain- a histochemical study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2010; 4: 3444-3449.
- [14] Michalany, J. Técnica histológica em anatomia patológica. 2.ed.São Paulo: Ed. Michalany, 1990; 126-127, 143-144.
- [15] Araújo VC, Demasi AP, Furuse C, Altemani A, Alves VA, Freitas LL, Araújo NS.. Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and beta-catenin in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morpholog*. 2009;17 (4): 312-318.
- [16] Félix A, Rosa JC, Fonseca I, Cidadão A, Soares J. Pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical demonstration of the association between tenascin expression and malignancy. *Histopathology*. 2004; 45 (2):187-192.
- [17] Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R. et al., Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression. Of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal Cell Physiology*. 1992; 150: 534-544.
- [18] Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, et al., Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression. In adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cells lines. *Cancer Research*. 1992; 31: 325-335.
- [19] Sommers CL, Byer SW, Thompson EW, Torri JA, Gelmann EP. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research Treatment*. 1994, 31: 325-335.
- [20] Hemalatha A, Suresh TN, Kumar ML. Expression of vimentin in breast carcinoma, its correlation with Ki67 and other histopathological parameters. *Indian Journal of Cancer*. 2013; 50 (3): 189-194.
- [21] Chen MH, Yip GW, Tse GM, Moriya T, Lui PC, Zin ML, et al. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Modern Pathology*. 2008; 21: 1183-91.
- [22] Domagala W, Lasota J, Dukowicz A, Markiewski M, Striker G, Weber K, et al. Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas. *American Journal Pathology* 1990;137:1299-304.
- [23] Niveditha SR, Bajaj P. Vimentin expression in breast carcinomas. *Indian Journal Pathology Microbiology* 2003; 46: 579-84.
- [24] Thompson EW, Paik S, Brünner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, et al. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *Journal Cell Physiology*. 1992; 150: 534-44.
- [25] Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, et al. Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Research*. 1992; 52: 5190-7.
- [26] Strandberg JD, Goodman DG. Animal model of breast cancer. *American Journal of Pathology*. 1974; 75 (1): 225-228.
- [27] Bostock DE. Canine and feline mammary neoplasms. *Brasilian. Veterinary Journal*. 1996; 142: 506-515.
- [28] Queiroga F, Lopes C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstica Canine mammary tumours, research on new prognostic factors. *Revista Portuguesa Ciências Veterinárias* . 2002; 97 (543): 119-127.
- [29] Bomhard DE, Sandersl JV. Ultrastructure of mixed mammary-gland tumors in bitches. I. Incidence of myoepithelial cells in myxoid areas. *Virchows Archive Aantomy Pathological Anatomy and Histology*. 1973; 359 (1): 87-96.
- [30] Pulley LT. Ultrastructural and histochemical demonstration of myoepithelium in complex tumor of the canine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research*. 1973; 34 (12):1513-1522.

- [31] Alroy J., Weinstein, RS: Unusual cell junction complex in canine mammary adenocanthomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1976; 56: 667-670.
- [32] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, and DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998; 93: 705-716.
- [33] Dixon DA. Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Progress in Experimental Tumor Research*. 2003; 37: 52- 71.
- [34] Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G. Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal anti- inflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Research*. 1987; 47: 5340-5346.