MÁRCIA CAROLINA MILLÁN OLIVATO

**Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento
de mastocitomas caninos: estudos *in vitro*.**

São Paulo

2017

MÁRCIA CAROLINA MILLÁN OLIVATO

**Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento
de mastocitomas caninos: estudos *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

De acordo:

São Paulo
20017

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. 3471
FMVZ

Olivato, Márcia Carolina Millán
Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento de mastocitomas caninos: estudos *in vitro* / Márcia Carolina Millán Olivato. -- 2017.
118 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

1. Mastocitoma. 2. Cão. 3. Dicloroacetato. 4. Metformina. 5. Omeprazol. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Investigation of DCA for the treatment of canine mast cell tumors: in vitro studies. ", protocol number CEUAX 3891241115, under the responsibility Maria Lucia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day August 15, 2016.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento de mastocitomas caninos: estudos in vitro.", protocolado sob o CEUAX nº 3891241115, sob a responsabilidade de Maria Lucia Zaidan Dagli, 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 na reunião de 15 de agosto de 2016.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: OLIVATO, Márcia Carolina Millán

Título: **Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento de mastocitomas caninos:** estudos *in vitro*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que desde criança me incentivaram a estudar e se esforçaram para me oferecer o melhor ensino e oportunidades. Minha mãe alegra os meus dias e meu pai com seu otimismo incurável me mostra como sempre há uma luz no fim do túnel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, que ajudaram na minha formação pessoal e profissional. Em especial a minha avó Maria, de quem ainda sinto muita falta, apesar do tempo.

Aos amigos que fizeram parte da minha trajetória, me apoiando em momentos difíceis e comemorando comigo nas vitórias do percurso.

Ao meu namorado Eduardo, também grande amigo. Aos Benassi que sempre me tratam muito bem desde que os conheci e me proporcionam momentos muito especiais na praia e no interior.

Às minhas mentoras no laboratório, e que após esse período de mestrado considero como amigas, Ivone e Marcinha. Tiveram paciência e tempo para me ensinar a parte prática deste trabalho.

À Marguiti, pessoa essencial para o andamento do laboratório, com quem sempre tive conversas inspiradoras e motivacionais.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada: Andrea, Karen, Nayra (minha irmã postiça), Tati, Gabi, Vanessa, Adriana, Daniel, Marcello, Lucas, Rafael, Diego, Murilo, Jonathan. Tenho certeza que esta equipe tornou o mestrado mais leve e divertido, até em tempo de resultados difíceis. Agradeço a colaboração e ensinamentos de todos.

A todos os professores, funcionários e colegas de pós-graduação do VPT, que também foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Milena que responde todas as dúvidas prontamente e sempre com um sorriso no rosto, além de ser conselheira e um calmante para os momentos tensos.

Aos professores Bruno Cogliati e Cristina Massoco, que desde o período da graduação sempre estão dispostos a tirar dúvidas e ouvir sobre o projeto que está sendo realizado. Em especial à profa Cris por ter me dado a oportunidade de utilizar o citômetro de fluxo.

À Nicolle, que tirou dúvidas de todos os passos da citometria de fluxo e sem a qual não seria possível concluir este teste.

Aos funcionários da biblioteca que foram fundamentais nesta reta final, especialmente à Evadne.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o período de mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro no projeto sobre dicloroacetato.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço especialmente às duas professoras que são minha fonte de inspiração para seguir a carreira científica:

Profa Maria Lucia Zaidan Dagli, admiro como pesquisadora e como pessoa. É uma honra fazer parte do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada e só tenho a agradecer pela fé depositada em mim desde a graduação.

Profa Claudia Mori, me deu total apoio durante a iniciação científica mostrando excelência e ética em todos os momentos. Apesar de não ser mais minha orientadora sempre está animada e disposta a ajudar e conversar.

*Antes de entrar numa batalha, é preciso acreditar no
motivo da luta.*

Sun Tzu

RESUMO

OLIVATO, M. C. M. Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento de mastocitomas caninos: estudos *in vitro*. [Investigation of the dichloroacetate (DCA) for the treatment of canine mast cell tumors: in vitro studies]. 2017. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O efeito Warburg ou glicólise aeróbica é o fenômeno em que células tumorais convertem a glicose a ácido láctico mesmo na presença de oxigênio, diferentemente das células normais do organismo que realizam o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa. O dicloroacetato de sódio (DCA) ativa a piruvato desidrogenase (PDH), resultando no aumento de piruvato dentro da mitocôndria e no restabelecimento do metabolismo normal da respiração celular. Estudos apontam que a associação de DCA com metformina ou omeprazol potencializam esse efeito. Os mastocitomas caninos são neoplasias originárias de mastócitos, sendo bastante prevalente entre os cães, por isso a importância de averiguar novas terapias para esta doença. O objetivo geral deste projeto foi investigar o efeito do DCA em mastocitomas caninos, por meio da realização de ensaios *in vitro*. Também foram investigados os efeitos do tratamento com DCA associado ao omeprazol ou metformina em linhagens de mastocitoma canino. As linhagens de mastocitoma canino utilizadas, grau 2 e 3, foram estabelecidas no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparadas da FMVZ/USP e foram cultivadas em meio AIM-V. As células foram tratadas com diversas concentrações de DCA (de 0,31 a 100mM). O DCA 0,1; 0,5; 1,0; 5, 10 e 20mM foi também testado em associação com metformina (0,02; 0,2 e 2mM) ou com omeprazol (0,02; 0,1 e 0,2mM). Após os tratamentos, foi realizado ensaio para analisar a viabilidade celular utilizando o método do cristal violeta, com leituras em 3 e 5 dias. Ao contrário do que era esperado, o tratamento com dicloroacetato isolado ou com associações aumentou a população de células neoplásicas principalmente nas concentrações de 10 e 20mM. Num experimento realizado com três linhagens diferentes

de mastocitomas caninos foram utilizadas concentrações de 10 a 100mM de DCA, e mostrou que a partir de 60mM há diminuição da viabilidade celular, sendo que o efeito se intensifica com o aumento das concentrações de DCA. Concluimos que o tratamento com DCA isoladamente, em concentrações de até 60mM, ou as associações com metformina e omeprazol não foi eficaz em diminuir a população de células de mastocitomas canino de graus 2 e 3 *in vitro*. Consideramos que a realização deste estudo foi importante para obter informações sobre os efeitos do DCA e associações em mastocitomas caninos. Os resultados deverão ser divulgados e evitarão o uso indiscriminado deste fármaco, cujas consequências poderiam ser adversas para os cães portadores de mastocitomas.

Palavras-chave: Mastocitoma. Cão. Dicloroacetato. Metformina. Omeprazol.

ABSTRACT

OLIVATO, M. C. M. Investigation of the dichloroacetate (DCA) for the treatment of canine mast cell tumors: in vitro studies. [Investigação do dicloroacetato de sódio (DCA) para tratamento de mastocitomas caninos: estudos *in vitro*]. 2017. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The Warburg effect or aerobic glycolysis is a phenomenon in which tumor cells convert glucose to lactic acid in the presence of oxygen, unlike normal cells in the body that perform the Krebs' cycle and oxidative phosphorylation. Sodium dichloroacetate (DCA) activates pyruvate dehydrogenase (PDH), resulting in increased pyruvate within the mitochondria and in the reestablishment of normal metabolism of cellular respiration. Studies indicate that the association of DCA with metformin or omeprazole potentiate this effect. Canine mastocytomas are neoplasms originating from mast cells, being quite prevalent among dogs, so the importance of investigating new therapies for this disease. The general objective of this project was to investigate the effect of DCA on canine mast cell tumors, by performing in vitro tests. The treatment with dca DCA was then associated with omeprazole or merformin in canine mastocytoma cell lines. The canine mast cell tumor lines used, grade 2 and 3, were established in the Laboratory of Experimental and Comparative Oncology of FMVZ / USP and were cultured in AIM-V medium.. Treatment with DCA alone was performed with varying concentrations (0,31 mM to 100 mM). The associations were performed with 0,1; 0,5; 1,0; 5, 10 and 20 mM of DCA with 0,02; 0,2 and 2mM of metformin or with 0,02; 0,1 and 0,2 mM of omeprazole. After the treatments, an assay was performed to analyze cell viability using the crystal violet method, with readings at 3 and 5 days. Contrary to our expectations, treatment with dichloroacetate alone or with combinations increased the population of neoplastic cells mainly in the concentrations of 10 and 20mM. In an experiment with three different canine mastocytomas cell lines treated with DCA

(10 to 100mM of DCA.), it was found that from 60mM the cell viability was decreased. This effect was intensified with increasing DCA concentrations. We conclude that treatment with DCA alone, at concentrations up to 60mM, or associated with metformin and omeprazole were not effective to decrease the population of canine mast cell tumors of grades 2 and 3 *in vitro*. The results should be disclosed and will avoid the indiscriminate use of this drug, the consequences of which could be adverse for dogs with mastocytomas.

Keywords: Mast cell tumor. Dog. Dichloroacetate. Merformin. Omeprazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mediadores solúveis liberados dos mastócitos desgranulados	30
Figura 2 - Abordagem terapêutica sugerida para tumores de baixo grau ou intermediários.....	36
Figura 3 - Esquema da oxidação completa da glicose.....	39
Figura 4 - Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbia e glicólise aeróbica (efeito Warburg).....	40
Figura 5 – Esquema do mecanismo de ação do DCA.....	42
Figura 6 - Esquema da alteração no microambiente de células tumorais tratadas e não tratadas com Inibidor da Bomba de Prótons (IBPs)	45
Figura 7 - Delineamento experimental para o tratamento de mastocitoma canino <i>in vitro</i>	55
Figura 8 - Fotomicrografias das linhagens de mastocitoma canino.....	61
Figura 9 - Célula da linhagem T18 corada com azul de toluidina.....	61
Figura 10 - Fotomicrografia da linhagem T18 corada com cristal violeta na concentração de 1x10 ⁴ cels/ml.....	63
Figura 11 - Viabilidade celular da linhagem B16.F10 após o tratamento com DCA, MET e OMP isolados.....	68
Figura 12 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Controle do tratamento com MET 2mM.....	71
Figura 13 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Células tratadas com combinação de 2mM MET e 10 mM de DCA...	71
Figura 14 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Controle do tratamento com OMP 0,1mM.....	71
Figura 15 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Células tratadas com combinação de 0,1mM OMP + 5 mM de DCA..	71
Figura 16 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 5 dias. Controle com DMSO.....	72

Figura 17 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 5 dias. Células tratadas com 0,02mM OMP + 20 mM de DCA.....	72
Figura 18 - Tratamento de células de mastocitoma T18 com omeprazol e metformina isolados.....	73
Figura 19 - Fotomicrografia da linhagem T18. Controle sem tratamento após 3 dias.....	76
Figura 20 - Fotomicrografia da linhagem T18 após três dias de tratamento com 10mM de DCA e 2mM de MET.....	76
Figura 21 - Fotomicrografia da linhagem T18 após três dias de tratamento com 20mM de DCA e 0,02mM de OMP.....	76
Figura 22 - Fotomicrografia da linhagem T18.....	76
Figura 23 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 5 dias de tratamento com 10mM de DCA.....	76
Figura 24 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 5 dias de tratamento com a combinação de 10mM de DCA e 0,2mM de OMP.....	76
Figura 25 - Tratamento de células de mastocitoma T6 com omeprazol e metformina isolados.....	77
Figura 26 - Fotomicrografia após 72horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Controle.....	80
Figura 27 - Fotomicrografia após 72horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com 20mM de DCA.....	80
Figura 28 - Fotomicrografia após 72horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com combinação de 0,02mM de MET e 20mM de DCA.....	80
Figura 29 - Fotomicrografia após 72horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com combinação de 0,1mM de OMP e 20mM de DCA.....	80
Figura 30 - Fotomicrografia após 5 dias da linhagem T6 corada com cristal violeta. Controle.....	80
Figura 31 - Fotomicrografia após 5 dias da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com combinação de 0,1mM de OMP e 20mM de DCA.....	80

Figura 32 - Controle de células coradas com PI*.....	82
Figura 33 - Morte das células coradas com PI, submetidas ao tratamento de 100mM de DCA*	82
Figura 34 – Morte basal das células das células coradas com PI, submetidas ao tratamento de 20mM de DCA*	82
Figura 35 - Fotomicrografia da linhagem T18 no experimento para análise por citometria de fluxo. Controle sem tratamento após 72h.....	83
Figura 36 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 72h após o tratamento com a combinação de 20mM de DCA e 2mM de MET	83
Figura 37 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 72h do tratamento com a combinação de 100mM de DCA.....	83
Figura 38 - Fotos no terceiro dia de tratamento da linhagem T6 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta.....	87
Figura 39 - Fotos no quinto dia de tratamento da linhagem T6 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta.....	88
Figura 40 - Fotos no terceiro dia de tratamento da linhagem T17 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta.....	89
Figura 41 - Fotos no quinto dia de tratamento da linhagem T17 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta.....	90
Figura 42 - Fotos no terceiro dia de tratamento da linhagem T18 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta.....	91
Figura 43 - Fotos no terceiro dia de tratamento da linhagem T18 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta.....	92

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento da linhagem T18.....	62
Gráfico 2 - Viabilidade celular em relação ao controle de células T18 tratadas com DCA.....	64
Gráfico 3 - Viabilidade celular em relação ao controle de células T18 tratadas com MET.....	64
Gráfico 4 - Viabilidade celular em relação ao controle de células T18 tratadas com OMP.....	65
Gráfico 5 - Viabilidade celular em relação ao controle de células de melanoma canino tratadas com DCA.....	66
Gráfico 6 - Viabilidade celular em relação ao controle de células de melanoma canino tratadas com OMP.....	66
Gráfico 7 - Viabilidade celular em relação ao controle de células de melanoma canino tratadas com MET.....	67
Gráfico 8 - Tratamento de células da linhagem B16 - F10 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72horas.....	69
Gráfico 9 - Tratamento de células da linhagem B16-F10 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.....	69
Gráfico 10 - Tratamento de células da linhagem B16-F10 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 3 dias.....	70
Gráfico 11 - Tratamento de células da linhagem B16-F10 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.....	70
Gráfico 12 - Tratamento das células da linhagem T18 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72horas.....	73
Gráfico 13 - Viabilidade celular das células T18 após tratamento com combinação de DCA e MET: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.....	74

Gráfico 14 - Tratamento da combinação entre DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72hora.....	75
Gráfico 15 - Tratamento da combinação entre DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.....	75
Gráfico 16 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72horas.....	78
Gráfico 17 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.....	78
Gráfico 18 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72horas.....	79
Gráfico 19 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.....	79
Gráfico 20 - Percentual de células mortas analisada por citometria de fluxo.....	81
Gráfico 21 - Tratamento da linhagem T17 com diversas concentrações de DCA após 72h.....	85
Gráfico 22 - Tratamento da linhagem T17 com diversas concentrações de DCA após 5 dias.....	85
Gráfico 23 - Tratamento da linhagem T18 com diversas concentrações de DCA após 72h.....	85
Gráfico 24 - Tratamento da linhagem T18 com diversas concentrações de DCA após 5 dias.....	85
Gráfico 25 - Tratamento da linhagem T6 com diversas concentrações de DCA após 72h.....	86
Gráfico 26 - Tratamento da linhagem T6 com diversas concentrações de DCA após 5 dias.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estadiamento clínico dos mastocitomas caninos segundo a Organização Mundial da Saúde.....	35
Quadro 2 - Dados da origem das linhagens de mastocitoma canino utilizadas.....	51
Quadro 3 - Concentrações finais utilizadas no tratamento das células T18.....	55
Quadro 4 - Esquema da placa utilizada para tratamento das células B16-F10 e YAN.....	56
Quadro 5 - Esquema das placas utilizadas nos experimentos de associação.....	57
Quadro 6 – Preparo das soluções para os tratamentos.....	59
Quadro 7 - Resultados do tratamento com DCA em linhagens T18 e T6.....	93
Quadro 8 - Resultados do tratamento com MET em linhagens T18 e T6.....	93
Quadro 9 - Resultados do tratamento com OMP em linhagens T18 e T6.....	94
Quadro10 - Resultado das associações DCA + MET e DCA + OMP em linhagens T 18 T6.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
DCA	Dicloroacetato
OMP	Omeprazol
MET	Metformina
MCp	Células Progenitores de Mastócitos
CD34 ⁺ ,	Progenitores Hematopoiéticos CD34+
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
FcεR	Receptores Fcε de alta afinidade
IL-3	Interleucina -3
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
FcγRII	Receptores de baixa afinidade
FcγRIII	Receptores de baixa afinidade
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
SF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
PHCs	Concentrações plasmáticas de histamina
PA	Punção por agulha fina
IM	Índice Mitótico
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
C ₆	Glicose
C ₃	Piruvato
PDC	Complexo Piruvato Desidrogenase
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
LDH	Lactato Desidrogenase
P	Fosfato
PDH	Piruvato Desidrogenase
PDK1	Quinase Piruvato Desidrogenase
LDHA	Lactato Desidrogenase A

PET	Pósitron Emission Tomography
FDG-18	Fluordesoxiglicose - 18
NO	Óxido Nítrico
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
DMSO	Dimetilsulfóxido
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP	Universidade de São Paulo
PBS	Tampão fosfato
RPM	Rotações por Minuto
CO ₂	Dióxido de Carbono
SFB	Soro Fetal Bovino
PVP-40	Polivinilpirolidona - 40
YAN	linhagem de melanona oral canino

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrômetro
cm	Centímetro
Da	Daltons
mM	Milimol
μg	Micrograma
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
ml	Mililitro
μl	Microlitro
μM	Micromol
H^{+}	prótons
e	elétron

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	MASTÓCITO	28
2.2	MASTOCITOMA	30
2.2.1	Incidência e etiologia	30
2.2.2	Sinais clínicos	32
2.2.3	Diagnóstico e características histopatológicas	33
2.2.4	Fatores prognósticos	34
2.2.5	Tratamento	35
2.2.6	Cultura celular primária de mastocitomas caninos	37
2.3	METABOLISMO CELULAR	38
2.3.1	Metabolismo de células normais	38
2.3.2	Metabolismo de células tumorais	39
2.4	DICLOROACETATO (DCA)	41
2.5	OMEPRAZOL (OMP)	44
2.6	METFORMINA (MET)	46
2.7	CRISTAL VIOLETA	47
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	FÁRMACOS	49
4.2	CULTURA DE CÉLULAS	50
4.2.1	Mastocitoma	50
4.2.2	Linhagens de mastocitomas utilizadas	51
4.3	CULTIVO CELULAR	51
4.4	LINHAGENS DE MELANOMA MURINO E CANINO UTILIZADAS COMO CONTROLES	53
4.5	ENSAIO DO CRISTAL VIOLETA	53
4.6	CITOMETRIA DE FLUXO	54
4.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	54
4.7.1	Curva de crescimento	54

4.7.2	Tempo dos experimentos.....	54
4.7.3	Experimento 1. Tratamento da linhagem t18 com dicloroacetato, omeprazol e metformina isolados.....	55
4.7.4	Experimento 2. Tratamento da linhagem b16-f10 e células de melanoma canino (yan) com dicloroacetato, omeprazol e metformina isolados.....	56
4.7.5	Experimento 3. Associações entre dicloroacetato, omeprazol e metformina nas linhagens b16-f10, t18 e t6.....	57
4.7.6	Experimento 4. Análise de morte celular por citometria de fluxo.....	58
4.7.7	Experimento 5. Determinação da faixa de resposta das células de mastocitoma canino t6, t17 e t18 ao dca.....	59
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS	61
5.1	CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE MASTOCITOMA.....	61
5.2	CURVA DE CRESCIMENTO.....	62
5.3	TRATAMENTO DA LINHAGEM T18 COM DICLOROACETATO, OMEPRAZOL E METFORMINA POR 3 E 5 DIAS	63
5.4	TRATAMENTO DA LINHAGEM B16-F10 E CÉLULAS DE MELANOMA CANINO (YAN) COM DICLOROACETATO, OMEPRAZOL E METFORMINA.....	65
5.5	ASSOCIAÇÕES ENTRE DICLOROACETATO, OMEPRAZOL E METFORMINA.....	67
5.5.1	Tratamento da linhagem B16-F10.....	67
5.5.2	Tratamento da linhagem T18.....	72
5.5.3	Tratamento da linhagem T6.....	77
5.6	ANÁLISE DA MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	81
5.7	FAIXA DE RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MASTOCITOMA CANINO T6, T17 E T18 AO DCA.....	84
5.8	RESUMO DOS RESULTADOS.....	93
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106

1. INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, neoplasias são motivo de preocupação. No caso de cães, pesquisas baseadas em necropsias apontam que 45% dos cães com dez anos ou mais morreram por causa de câncer, sendo também responsável pela morte de 23% do total de cães necropsiados (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013). A neoplasia cutânea que mais acomete os cães é o mastocitoma, representando de 7 a 21% (GROSS et al., 2005; BOSTOCK, 1986). Dados brasileiros mais recentes corroboram com esse dado, um estudo retrospectivo analisando biópsias e necropsias feitas no Serviço de Patologia da FMVZ/USP entre 1993 e 2002 observou que as neoplasias mais comuns em cães foram os adenocarcinomas mamários e mastocitomas (KIMURA; GÁRATE; DAGLI, 2012). Outro estudo realizado na Universidade Federal de Santa Maria avaliou 761 tumores de cães dos quais 20,9% eram mastocitomas (SOUZA et al., 2006).

O motivo mais importante para a performance ineficiente dos quimioterápicos é a heterogeneidade e adaptabilidade das células tumorais. As características moleculares frequentemente são diferentes dentro do mesmo tipo tumoral, isso tem implicações importantes e evidencia que os medicamentos devem ser desenvolvidos e testados para tumores molecularmente definidos sendo que os efeitos podem ser diferentes em cada caso. Porém, o maior desafio no desenvolvimento de novas terapias contra o câncer é induzir morte celular em células tumorais e não nas normais (MICHELAKIS; WEBSTER; MACKEY, 2008).

O metabolismo de células tumorais tem sido alvo de terapias por causa do efeito Warburg ou glicólise aeróbica, em que mesmo na presença de oxigênio a produção de energia é desviada para a produção de lactato, diferentemente de células normais em que ocorre na mitocôndria o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa culminando na produção de 36 ATPs. O dicloroacetato de sódio tem aparecido como uma nova promessa no tratamento antitumoral por reverter esse metabolismo alterado, prejudicando a sobrevivência de células malignas. Além do

uso de dicloroacetato isolado, estudos mostram que o tratamento associado com metformina e omeprazol potencializam a morte de células tumorais.

O objetivo desta dissertação foi tratar linhagens de mastocitoma canino com diferentes concentrações de dicloroacetato e analisar a viabilidade celular após o tratamento por meio do ensaio de cristal violeta. O tratamento com 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20mM de dicloroacetato de sódio foi associado com 0,02; 0,2 e 2mM de metformina e 0,02; 0,1 e 0,2mM de omeprazol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTÓCITO

Os mastócitos são células grandes e globosas (15 a 20 μm de diâmetro) que se encontram no tecido conjuntivo, sob superfícies mucosas na pele e ao redor de nervos. O núcleo é pequeno, esférico, central e difícil de ser observado por estar frequentemente encoberto por grânulos citoplasmáticos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; TIZARD, 2009). Rotineiramente não são vistos em secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, mas um número considerável de mastócitos são encontrados em tecidos fixados apropriadamente quando usados corantes como Azul de Toluidina e Alcian Blue (KITAMURA, 1989). A metacromasia característica dos mastócitos é devida a concentração alta de radicais ácidos presentes nos glicosaminoglicanos dos grânulos (KITAMURA, 1989; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os mastócitos são derivados da medula óssea, porém não na sua forma madura. O desenvolvimento dos progenitores de mastócitos (MCp) é regulado por fatores de transcrição durante a hematopoese e os mastócitos terminam sua maturação nos tecidos periféricos (DAHLIN; HALLGREN, 2015). Kirshenbaum et al. (1991) concluíram que tanto basófilos quanto mastócitos surgem de células CD34⁺, já que em cultivo celular continuaram a crescer mesmo quando progenitores de células T, B, macrófagos e eosinófilos foram retirados, porém não foram vistos em cultura quando foram suprimidas as células CD34⁺.

A maturação dos precursores no tecido depende do fator de células tronco (stem cell fator - SCF) expresso na superfície de fibroblastos, células estromais e células endoteliais que se ligam ao KIT dos mastócitos (STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2011). Precursores de mastócitos c-Kit⁺ derivados da medula óssea, com receptores Fc ϵ RI⁺, migram para tecidos vascularizados e se fixam onde completam sua diferenciação dependendo dos fatores presentes em cada tecido

(GALLI; HAMMEL, 1994). A IL-3 também possui importante papel na diferenciação dos mastócitos. Lantz et al. (1998) observaram que camundongos com deficiência de IL-3 possuem menos mastócitos e basófilos, tornando infecções parasitárias mais severas.

A ativação dos mastócitos pode ser dependente ou independente do receptor $Fc\epsilon RI+$. A ativação dependente utiliza a interação entre um antígeno com o anticorpo IgE e sua ligação à membrana do mastócito por causa da alta afinidade com o receptor $Fc\epsilon RI+$. Essa ligação cruzada causa a liberação e síntese de mediadores pela ativação de tirosino-quinases (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2011). Os mastócitos também possuem receptores de baixa afinidade para IgG denominados $Fc\gamma RII$ e $Fc\gamma RIII$. A ativação ocorre pela agregação de IgG ou imunocomplexos que promovem a adesão, degranulação e síntese de $TNF-\alpha$ pelos mastócitos. Além disso, peptídeos, citocinas e GM-CSF, quimiocinas, fatores da cascata complemento e glico-proteína oligodendrítica mielínica também ativam os mastócitos (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997; ROBBIE-RYAN; BROWN, 2002; STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2011).

A característica morfológica mais específica é o conteúdo elétron-denso, os grânulos (lisossomais secretores) que ocupam a maior do citoplasma de mastócitos maduros. Os grânulos contêm aminas, como histamina e serotonina, além de hidrolases lisossomais. Os mastócitos possuem também capacidade de armazenar citocinas e fatores de crescimento, por exemplo, fator de necrose tumoral e fator de crescimento endotelial vascular. Proteases específicas de mastócitos, incluindo triptase, quimases e carboxipeptidases são os maiores constituintes dos grânulos (TIZARD, 2009; WERNERSSON; PEJLER, 2014).

Figura 1 – Mediadores solúveis liberados dos mastócitos desgranulados.

Fonte: TIZARD, I. R., 2009

Os mediadores solúveis liberados dos mastócitos são classificados em três categorias: moléculas liberadas de grânulos exocitados, lipídios (eicosanoides) sintetizados dentro de minutos, e proteínas sintetizadas dentro de algumas horas (Figura 1) (TIZARD, 2009).

2.2 MASTOCITOMA

2.2.1 Incidência e etiologia

O mastocitoma representa a forma mais frequente de tumor em cães, com cerca de 16% a 21% de todos os tumores cutâneos (BOSTOCK, 1986). Ocorrem principalmente entre a faixa etária de 8 a 9 anos, porém existem casos reportados em animais mais jovens, sem predisposição sexual (GIEGER et al., 2003; THAMM; TUREK; VAIL, 2006).

Pesquisas brasileiras também afirmam esses dados. Um estudo retrospectivo sobre mastocitoma canino realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo mostrou que no período de 2000 a 2007 foram diagnosticados 260 casos de mastocitomas por exames histopatológicos (COSTA-CASAGRANDE, T.A.; ELIAS, D.S.; MELO, S.R.; MATERA, 2008). Outro estudo realizado na Universidade Federal de Santa Maria avaliou 761 tumores de cães, dos quais 20,9% eram mastocitoma (SOUZA et al., 2006). Em ambos não havia predisposição sexual e a maior frequência de idade foi de 8 anos ou mais (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984). Algumas raças são mais predispostas à ocorrência de mastocitoma, principalmente as descendentes de Buldogues (Boxers, Boston terriers, English Buldogues e Pugs), mas também Labrador, Golden retrievers, Cocker spaniels, Schnauzers, Staffordshire terriers, Beagles, Rhodesian ridgebacks, Weimaraners, SharPeis e raças não definidas (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; COSTA-CASAGRANDE, T.A.; ELIAS, D.S.; MELO, S.R.; MATERA, 2008; WITHROW; VAIL; PAGE, 2013).

A patogenia ainda não é bem esclarecida, porém a incidência em certas raças sugere a possibilidade de fatores genéticos estarem envolvidos na etiologia desta doença. Um estudo com cães da raça Pug mostrou que na maioria dos casos aparecem múltiplos nódulos, porém com comportamento benigno (MCNIEL; PRINK; O'BRIEN, 2006) enquanto cães da raça SharPei parecem desenvolver mastocitomas mais agressivos (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013).

Mutações e aberrações nas expressões do c-Kit têm sido descritas em mastocitoma caninos, assim como em outros tumores incluindo câncer de pulmão, próstata e leucemia mieloblástica aguda. O c-Kit é um receptor tirosina-quinase, que parece ter um papel importante no desenvolvimento dos mastocitomas caninos. Foi demonstrado que possui pontos de mutação nos exons 11 e 12 (dentro do domínio justa membrana do c-Kit) e exons 8 e 9 (no domínio extracelular), fazendo com que o c-Kit se mantenha continuamente ativado favorecendo o desenvolvimento de

neoplasias (LONDON et al., 1999; LETARD et al., 2008; WITHROW, VAIL, PAGE, 2013).

2.2.2 Sinais clínicos

A maioria dos mastocitomas ocorrem na derme e epiderme, apresentam-se de forma circunscrita em nódulos cutâneos. Aproximadamente 50% dos mastocitomas cutâneos ocorrem no tronco e região perineal, 40% nos membros e 10% na cabeça e pescoço (WITHROW; VAIL; PAGE; 2013). Estudo de Souza et al (2006) observou que o mastocitoma foi prevalente na cabeça, pescoço, membro posterior, tórax, abdômen, dorso e escroto, além de ser o mais frequentemente visto na forma multicêntrica. O comportamento dos mastocitomas cutâneos é imprevisível e sua aparência pode ser semelhante a de outros tumores (MACY, 1985). Mastocitomas bem diferenciados são solitários, pequenos, com crescimento lento. Geralmente não são ulcerados, porém a área pode ter alopecia. Já os tumores indiferenciados têm rápido crescimento, lesões ulceradas que causam irritação e podem levar a um ferimento de grandes dimensões. A área ao redor pode estar edematosa e inflamada (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013).

Os animais com mastocitoma também podem apresentar sinais clínicos como resultado da liberação de histamina e heparina a partir dos grânulos de mastócitos. As síndromes paraneoplásicas incluem ulcerações gástricas e duodenais, cicatrização retardada e reações anafiláticas. Também foi observado que os animais acometidos possuem maior tempo de coagulação e deficiência na produção de anticorpos (STANNARD; PULLEY, 1978; PELT; FOWLER; LEIGHTON, 1986). Durante a manipulação do tumor os mastócitos podem degranular, causar eritema local e formação de pápulas ao redor do tumor. No sistema gastrointestinal a histamina estimula as células parietais do estômago por meio dos receptores H_2 , promovendo aumento da secreção de ácido clorídrico.

No Japão, Ishiguro et al (2003) mediram durante nove meses as concentrações plasmáticas de histamina (PHCs) de 11 cães com mastocitoma. Foi

observado que os cães com a doença mais avançada tiveram inicialmente concentrações elevadas em relação aos animais saudáveis, enquanto os animais com a doença no menor estágio não tiveram diferença em relação aos controles. Sete cães tiveram aumentos progressivos e desenvolveram hiperhistaminemia. Sendo assim, os autores sugerem que a concentração de histamina pode ser medida para monitorar o avanço da doença.

2.2.3 Diagnóstico e características histopatológicas

O diagnóstico citológico é feito por meio de punção por agulha fina (PAF) ou por decalque das lesões sobre lâmina de microscópio (SÉGUIN et al., 2001). A citologia de mastocitoma revela população discreta de células redondas, com moderada quantidade de citoplasma contendo grânulos cor púrpura. O núcleo é arredondado ou oval e pode ser mascarado em células com muitos grânulos. Os grânulos dos mastócitos podem ser corados com corantes hematológicos de rotina como Wright's, Giemsa, Leishman, assim como com a coloração de Romanowsky que é utilizada na prática (BOSTOCK, 1986; GOVIER, 2003; WELLE et al., 2008; WITHROW; VAIL; PAGE, 2013).

O exame histopatológico é necessário para confirmação do diagnóstico e determinar o futuro tratamento. Existem três métodos de graduação histopatológica descritas. Em 1986, Bostock descreveu os critérios para caracterizar os tumores em bem diferenciados (grau 3), intermediários (grau 2) ou pobremente diferenciados (grau 1). Os bem diferenciados histologicamente aparecem como uma infiltração difusa de mastócitos bem diferenciados pela derme com poucas figuras de mitose. Já os pobremente diferenciados são uma infiltração maciça de mastócitos na derme e no músculo superficial. O núcleo se mostra basófilo e irregular, mitoses são frequentemente observadas, além de células gigantes multinucleadas.

Patnaik et al (1984) classificou os mastocitomas em grau 1, 2 e 3, sendo o grau 1 o tumor bem diferenciado. A classificação leva em conta a morfologia celular

e do núcleo, índice mitótico, celularidade e extensão do tecido envolvido, sendo também observadas se há presença de grânulos, hemorragia ou necrose. Foi observado que apesar da graduação ter critérios bem definidos, os patologistas divergem na classificação do mesmo tumor.

Kiupel et al. (2011) propôs um sistema em dois graus, alto grau e baixo grau. Este sistema é baseado em número de figuras mitóticas com cariomegalia, células multinucleadas ou com núcleos bizarros. O mastocitoma é considerado de alto grau quando apresenta uma dessas características: pelo menos 7 figuras de mitose em 10 campos de maior aumento, pelo menos 3 células multinucleadas (3 ou mais núcleos) em 10 campos de maior aumento, pelo menos 3 núcleos bizarros em 10 campos de maior aumento ou presença de cariomegalia.

2.2.4 Fatores Prognósticos

Alguns fatores clínicos podem influenciar no prognóstico da doença, como, localização, aparência clínica do tumor, taxa de crescimento, tamanho, presença de sinais paraneoplásicos e estadiamento clínico (MACY, 1985; MISDORP, 2004; WITHROW, VAIL; PAGE, 2013). O grau histopatológico é o fator prognóstico mais confiável para cães com mastocitoma (PATNAIK; EHLER; MACEWEN, 1984; BOSTOCK, 1986). Tumores localizados em dígito, cavidade oral, prepúcio, região perineal ou muco cutânea estão frequentemente relacionados com pior prognóstico (WELLE et al., 2008). Gieger et al. (2003) observaram que animais com tumores em membros tratados com radioterapia tiveram melhor prognóstico que animais com o tumor localizado no tronco.

Mullins et al. (2006) analisou o histórico de 54 cães com mastocitomas e verificou que as taxas de sobrevida de 1 ano e de 2 a 5 anos foi de 87% e 85% respectivamente. Os fatores prognósticos que influenciaram negativamente a taxa de sobrevida foram excisão incompleta do tumor, local de recidiva, tamanho do tumor maior que 3 cm, sinais clínicos ao diagnóstico e uso de terapia adjuvante.

Quadro 1 - Estadiamento clínico dos mastocitomas caninos segundo a Organização Mundial da Saúde

Estágio	Descrição
0	Tumor único, incompletamente excisado da derme, identificado histologicamente, sem envolvimento dos linfonodos a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
I	Tumor único confinado à derme sem envolvimento regional do linfonodo a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
II	Tumor único confinado à derme com envolvimento regional do linfonodo a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
III	Múltiplos tumores ou tumores grandes infiltrativos, como ou sem envolvimento de linfonodos a. Sem sinais sistêmicos b. Com sinais sistêmicos
IV	Qualquer tumor com metástases distantes ou recorrências com metástases (incluindo envolvimento do sangue ou medula óssea)

Fonte: (WITHROW, VAIL, PAGE, 2013) Adaptado

Marcadores de proliferação celular também são utilizados como fatores prognósticos. Os mais utilizados são índice mitótico (IM), proteína Ki-67, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e proteínas associadas a região organizadora nuclear com afinidade pela prata (SCASE et al., 2006; STREFEZZI et al., 2010; FONSECA, 2014).

2.2.5 Tratamento

O tratamento de escolha para mastocitomas geralmente é cirúrgico, porém depende de sua apresentação inicial (BOSTOCK, 1986; MISDORP, 2004; WELLE et al., 2008; WITHROW;VAIL;PAGE, 2013). A excisão cirúrgica deve ser de 3 cm de tecido normal ao redor do tumor, tanto margens laterais quanto profundas. Todas

as margens cirúrgicas devem ser avaliadas histologicamente. Como podemos observar na figura 2 existem algumas opções quando a cirurgia não pode ser realizada ou quando o tumor não está em um local onde pode ser removido totalmente cirurgicamente. A amputação é um método mais agressivo e que garante margens cirúrgicas, porém a funcionalidade do membro amputado é perdida. A radioterapia também tem mostrado resultados satisfatórios quando utilizada como terapia primária. As combinações de quimioterapia e cirurgia, ou radioterapia e cirurgia também podem ser opções viáveis para o tratamento dos pacientes (WITHROW;VAIL;PAGE, 2013). Apesar da cirurgia com margem ser o mais indicado, Scase et al. (2006) mostraram que apenas de 20 a 30% dos mastocitomas retirados sem margem cirúrgica de segurança recidivaram.

Figura 2 – Abordagem terapêutica sugerida para tumores de baixo grau ou intermediários

Fonte: (WITHROW, VAIL, PAGE, 2013) Adaptado

O tratamento de mastocitomas indiferenciados ou de alto grau possui resultados mais frustrantes. Isso inclui cães com mastocitomas de grau intermediário com metástase regional ou distante ou tumores em membrana mucosa ou em junções muco cutâneas (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013). Alguns

estudos testaram a eficácia do tratamento quimioterápico após a cirurgia. A combinação entre prednisona e vimblastina em cães com mastocitoma de alto grau proporcionaram aos animais sobrevida de 1374 dias (THAMM; TUREK; VAIL, 2006).

2.2.6 Cultura celular primária de mastocitomas caninos

Para caracterização e estudo dos mastócitos foram desenvolvidas linhagens de humanos e camundongos. Exemplos são as células P-815 que foi originada de camundongos DBA/2 e HMC-1 proveniente de leucemia mastocitária de humanos (DUNN; POTTER, 1957; TSUJIMURA et al., 1994). Linhagens de mastocitomas caninos não estão comercialmente disponíveis, porém já estão descritas na literatura. Devinney & Gold (1990) estabeleceram as linhagens C₁ e C₂, e as mantiveram em cultura por mais de um ano. Ambas contêm grânulos metacromáticos no citoplasma corados por azul de toluidina, característicos dos mastocitomas. Além disso, verificou-se que o citoplasma possui histamina, triptase e quimase.

A linhagem CoMS foi obtida de mastocitoma da cavidade oral de um cão sem raça definida de 3 anos de idade. O cão foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade de Hokkaido com um edema no lábio inferior e com os linfonodos cervicais aumentados, apesar dos tratamentos o cão faleceu após 56 dias. As células CoMS foram coletadas na cirurgia e mantidas *in vivo* em camundongos SCID, e depois de excisados do tumor, a linhagem foi estabelecida *in vitro* (ISHIGURO et al., 1996). No Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ/USP linhagens de mastocitoma grau 1, 2 e 3 foram estabelecidas. As amostras foram retiradas de cães do Hospital Veterinário da FMVZ/USP e mantidas desde o início *in vitro* (FONSECA, 2014).

2.3 METABOLISMO CELULAR

2.3.1 Metabolismo de células normais

Para produção de células-filhas na mitose é necessária energia para que todo o conteúdo celular seja replicado. Em células normais a glicose participa da produção de 2 trifosfato de adenosina (ATP) por meio da glicólise, e pode gerar até 36 ATPs por meio de seu catabolismo completo realizado pelo Ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa (MARIE; SHINJO, 2011).

A oxidação completa da glicose se inicia no citosol, onde ocorre a glicólise, em que há a conversão da glicose (C_6) a 2 piruvato ($2C_3$). Na presença de oxigênio o piruvato entra na mitocôndria e é convertido a acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase (PDC). Na mitocôndria ocorre o ciclo de Krebs, também chamado de ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos. O ciclo tem origem com a condensação da acetil-CoA com o ácido oxalacético, produzindo o ácido cítrico, elétrons e prótons. Nas três etapas da oxidação da glicose (glicólise, descarboxilação do piruvato e ciclo de Krebs) os prótons e elétrons ($H^+ + e^-$) são produzidos em reações catalizadas por desidrogenases (ALBERTS et al., 2006; YELURI et al., 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo ($FADH_2$) são coenzimas que capturam esses elétrons e funcionam como transportadores. O NADH doa elétrons para o complexo I da cadeia de transporte de elétrons, enquanto o $FADH_2$ doa elétrons para o complexo II. O oxigênio é o último receptor de elétrons e por isso é essencial na via aeróbica. Entretanto, em condições de hipóxia ocorre a glicólise anaeróbica em que o piruvato é convertido à ácido láctico pela lactato desidrogenase (LDH) (YELURI et al., 2009).

Figura 3 - Esquema da oxidação completa da glicose

Fonte: Marzzoco & Torres, 2007. Adaptado.

Legenda: No citosol, a glicose é oxidada a piruvato e este, na mitocôndria, é oxidado a CO_2 . Os produtos da oxidação da glicose estão destacados em vermelho. Os $\text{(H}^+ + \text{e}^-)$ são recebidos por coenzimas (NADH e FADH_2); da oxidação destas coenzimas por oxigênio resulta a síntese da maior parte do ATP obtido pela oxidação da glicose.

2.3.2 Metabolismo de células tumorais

Em células tumorais ocorre um fenômeno chamado “efeito Warburg” ou glicólise aeróbica, em que ocorre conversão de glicose a ácido láctico mesmo na presença de oxigênio (GATENBY; GILLIES, 2004). Warburg, em 1925, após ensaios *in vitro* descobriu que a taxa de respiração de um tumor de rato quando comparada com a de tecidos de fígado e rim era consideravelmente menor. Afim de testar substâncias “nutritivas” para o tumor, Warburg adicionou aminoácidos, ácidos graxos e glicose à solução de Ringer na expectativa que o tumor aumentaria. Surpreendentemente, aminoácidos e ácidos graxos não tiveram efeito, enquanto a glicose suspendeu a respiração. Ao tentar descobrir por que isso aconteceu,

verificou que o ácido láctico apareceu na solução de Ringer, produzido pela glicólise, e que isso inibiu a respiração.

Warburg sugeriu que esta alteração na célula era consequência de uma “injúria respiratória” que caminhava para uma fermentação aeróbica, um evento considerado como “a origem do câncer” (WARBURG, 1956). Essa hipótese foi gradualmente sendo desacreditada, porém a observação experimental de aumento da glicólise nos tumores mesmo na presença de oxigênio foi repetidamente verificada e comprovada também por outros pesquisadores.

Em células tumorais alguns fatores encaminham o piruvato a ser convertido a lactato. A atividade da piruvato desidrogenase (PDH) é bloqueada pela quinase piruvato desidrogenase 1 (PDK1). Além disso, observa-se um aumento da atividade enzimática da lactato desidrogenase A (LDHA).

Figura 4 - Representação esquemática das diferenças entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg)

Fonte: (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009)

Legenda: Warburg observou que as células cancerosas tendem a converter a maior parte da glicose em lactato, independentemente de o oxigênio estar presente (glicólise aeróbica). As mitocôndrias permanecem funcionais e alguma fosforilação oxidativa continua em ambas as células cancerosas e em células proliferantes normais. No entanto, a glicólise aeróbica é menos eficiente do que a fosforilação oxidativa para gerar ATP.

Um exame complementar utilizado em oncologia é a tomografia por emissão de pósitrons (pósiton emission tomography - PET), uma técnica que tem o potencial de fornecer informações sobre a biologia do tumor auxiliando no diagnóstico e no prognóstico após o tratamento. Estudos com PET do metabolismo celular são realizados principalmente com derivados de glicose e aminoácidos. O radiofármaco mais utilizado é o fluordesoxiglicose-18F (FDG-18) (STRAUSS; CONTI, 1991). O FDG não é específico de doença neoplásica, mas sim um marcador de glicose. Algumas anormalidades podem produzir resultados falso-positivos em PET/CT como granulomatose, infecção ou inflamação (GALLAMINI; ZWARTHOED; BORRA, 2014).

Verificou-se que tumores hipóxicos, que requerem maior glicólise para sobreviver, são frequentemente mais invasivos e metastáticos do que aqueles com níveis normais de oxigênio. Postovit et al (2002) demonstraram que a hipóxia relacionada com a invasão tumoral está relacionada a sinalização de óxido nítrico (NO). Foram incubadas células de carcinoma mamário (MDA-MB-231) em 0,5% e 20% de oxigênio, sendo que na menor quantidade de oxigênio resultou em aumento da expressão de uroquinases, molécula relacionada com a invasão. *In vitro*, o efeito da hipóxia foi evitado tratando-se as células MDA-MB-231 com fármacos miméticos de NO.

2.4 DICLOROACETATO (DCA)

O dicloroacetato de sódio ($\text{Cl}_2\text{CHCO}_2\text{Na}$) é um composto de sabor amargo, inodoro, branco e com peso molecular de 151 daltons (Da). A constante de dissociação (K_a) do ácido livre em solução aquosa é $5,50 \times 10^{-2}$ e seu pK_a é 1,26 (STACPOOLE, 1989). Em 1969, Stacpoole foi o primeiro autor a publicar a farmacologia e efeitos terapêuticos do dicloroacetato (STACPOOLE, 1969). Desde então outros trabalhos surgiram para elucidar os mecanismos de ação, toxicologia

e potenciais clínicos, além de avaliarem os sais do ácido dicloroacético, análogos e derivados.

O dicloroacetato ativa a piruvato desidrogenase, o que resulta em aumento de piruvato dentro da mitocôndria (Figura 5). Este processo resulta em aumento da fosforilação oxidativa e despolarização da mitocôndria, retornando assim ao potencial de membrana de células não cancerígenas (MICHELAKIS et al., 2010). Bonnet et al., (2007) mostraram que o DCA altera o metabolismo das células tumorais para oxidação da glicose na mitocôndria. O DCA está associado com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), diminuição do potencial de membrana e da expressão dos canais K^+ Kv1.5 das mitocôndrias em células cancerosas, porém não das células normais.

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação DCA

Fonte: (MARIE; SHINJO, 2011) Modificado.

Legenda: O DCA ativa a piruvato desidrogenase, permitindo a entrada do piruvato na mitocôndria. Esse mecanismo reestabelece o funcionamento normal da respiração celular.

Vários estudos *in vitro* mostraram resultados usando o DCA como tratamento em diversos tipos de células tumorais. Madhok et al, (2010) investigaram os efeitos do DCA com diversas doses em células de câncer colorretal. Observaram que o

dicloroacetato reduziu o crescimento das células cancerosas e não cancerosas, sendo que as células tumorais se mostraram mais sensíveis com a dose de 20mM enquanto as células controle tiveram uma redução pouco significativa. Durante os experimentos foi medida a produção de ácido láctico e verificou-se que houve diminuição em células tumorais e controles. O tratamento com DCA levou a desfosforilação da piruvato desidrogenase subunidade α com componente E1 (PDHE1 α), ativando o complexo PDH em todas as linhagens estudadas. Pesquisas anteriores realizadas com células de câncer endometrial e próstata também mostraram alteração do potencial de membrana mitocondrial após tratamento com DCA (CAO et al., 2008; WONG et al., 2009).

O mecanismo de ação do dicloroacetato não parece ser o mesmo em diferentes tipos tumorais e linhagens. Na linhagem de adenocarcinoma mamário (MAT) o resultado *in vitro* determinou que a resposta celular depende do tempo e da dose utilizada, neste caso ocorreu maior perda da viabilidade celular no quarto dia pós tratamento com 5mM de dicloroacetato. Interessante que neste mesmo estudo foram avaliados proliferação, apoptose e morte celular, e verificou-se que apesar da diminuição evidente de proliferação celular na concentração de 5mM de DCA não ocorreu aumento na apoptose ou morte, assim como em linhagem de neuroblastoma (SUN et al., 2010; VELLA et al., 2012).

CAO et al. (2008) associou o tratamento com DCA e radiação em linhagens de tumores de próstata PC-3-Bcl2 (expressa mais Bcl-2) e PC-3-Neo. Ficou demonstrado que a combinação nas células PC-3-Neo ocorre aumento na expressão de Bax e alteração no potencial da membrana mitocondrial levando ao aumento das taxas de apoptose, enquanto as células PC-3-Bcl-2 também se mostraram mais sensíveis à radiação, porém este fato não pode ser relacionado com o aumento de apoptose.

Harting et. al (2016) avaliaram o efeito do tratamento com dicloroacetato 10mM *in vitro* em linhagens de adenocarcinomas e de carcinoma de células de transição em próstata de cães. Além do número de células, este estudo avaliou outros fatores como o nível de lactato, proliferação celular, apoptose e a expressão da piruvato desidrogenase (PDH). Em ambas linhagens houve redução no número

de células após 48 horas de tratamento com dicloroacetato, assim como também houve queda na proliferação celular (marcada pelo Ki67) e aumento de apoptose. Assim como já foi demonstrado em células de humanos, o tratamento diminuiu a fosforilação de PDH em todas as células tratadas, causando a queda nos níveis de lactato.

2.5 OMEPRAZOL (OMP)

A alteração do microambiente tumoral causa mudanças no gradiente de pH entre o ambiente extracelular e o citoplasma e entre o pH do citoplasma celular e os compartimentos lisossômicos, assim, o meio extracelular de tumores sólidos é mais ácido que o de tecidos normais. Vesículas lisossomais mais acidificadas também podem estar envolvidas no sequestro de fármacos, o que prejudica seu desempenho (LUCIANI et al., 2004).

As células tumorais possuem citosol alcalino e meio extracelular ácido, este gradiente colabora para progressão e metástase tumoral, além de conferir ao tumor resistência à quimioterápicos. Este pH é mantido pela atividade da enzima V-ATPase que retira prótons do meio intracelular. O omeprazol é um inibidor da bomba de prótons (IBPs) e pode aumentar o efeito de drogas anticancerígenas. No meio ácido os IBPs ficam ativados e inibem a atividade da V-ATPase, e assim, o microambiente tumoral é alterado (figura 6) (FAIS et al., 2007).

O omeprazol já foi testado em carcinoma epitelial de ovário (CEO), num estudo de coorte verificou-se que a alta expressão de V-ATPase mRNA está associada à pior sobrevida. *In vitro*, o pré-tratamento com omeprazol aumentou o efeito do quimioterápico paclitaxel. *In vivo*, utilizando modelos de camundongos transplantados com CEO, apenas os animais tratados anteriormente à quimioterapia com omeprazol tiveram a diminuição do volume tumoral (LEE et al., 2015).

Um estudo piloto prospectivo de fase II mediu a eficácia de um IBPs, o esomeprazol, combinado com o quimioterápico em mulheres com câncer de mama. A combinação mostrou que o efeito da associação aumenta a sobrevida global e o tempo de progressão da doença, não só durante o tratamento como também a continuação do IBP até 66 semanas depois (WANG et al., 2015). Esse resultado corroborou com estudo *in vitro* anterior que utilizou a combinação de doxorrubicina com esomeprazol em células de câncer de mama triplo negativas, as mais resistentes aos quimioterápicos. As células tratadas em associação tiveram menor viabilidade do que as não tratadas ou tratadas apenas com doxorrubicina. Isso se deve ao aumento do pH do microambiente tumoral aumentar a sensibilidade à doxorrubicina ou ao próprio efeito isolado do esomeprazol somado ao tratamento quimioterápico (GOH; SLEPTSOVA-FREIDRICH; PETROVIC, 2014).

Figura 6 - Esquema da alteração no microambiente de células tumorais tratadas e não tratadas com Inibidor da Bomba de Prótons (IBPs)

Fonte: FAIS et al., 2007

Tanto o dicloroacetato quanto o omeprazol inibem o crescimento de células tumorais produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e modificando o pH

intracelular. A geração de EROs é outro mecanismo dos IBPs, causando despolarização da membrana mitocondrial, liberação do fator indutor de apoptose (AIF) das mitocôndrias e depois apoptose (MAHONEY et al., 2003; DE MILITO et al., 2007).

A associação entre o dicloroacetato de sódio e omeprazol promete ser um promissor protocolo para tratamento anticâncer. Ishiguro et al (2012) demonstraram que a combinação entre DCA e omeprazol diminui a proliferação da linhagem de fibrossarcomas tumorais (HT1080), enquanto não fez efeito em fibroblastos humanos normais (WI-38). Além disso, a associação entre dicloroacetato e omeprazol foi testada *in vivo* em camundongos nude inoculados com HT1080 e mostrou ser mais eficiente que o tratamento com as drogas isoladas.

2.6 METFORMINA (MET)

A Metformina é o medicamento mais prescrito para o tratamento de diabetes. Seu histórico em uso medicinal é grande e pode ser rastreado desde o uso da *Galega officinalis*, uma erva medicinal utilizada na Europa medieval. Esta planta também é conhecida como Lilás francês, Sanfoin espanhol ou índigo falso (MORI et al., 1985; BAILEY; DAY, 2004).

Evans et al. (2005) foram os primeiros a identificar uma possível ligação entre o tratamento com metformina e o risco reduzido de câncer em pacientes com diabetes tipo 2 num estudo observacional que reuniu informações sobre o uso de metformina em diversos casos. Outro estudo de coorte foi realizado mais recentemente e também sugeriu que o tratamento com metformina diminui o risco de câncer. Menos de 8% dos usuários de metformina foram diagnosticados com câncer, enquanto 11% de não-usuários tiveram o diagnóstico durante o seguimento. Além disso, o tempo até o aparecimento do câncer foi maior entre os pacientes tratados, que tiveram também menor mortalidade relacionada com câncer (LIBBY et al., 2009).

A via na qual a metformina interfere no metabolismo celular é o eixo AMPK/mTor. Este eixo está sob controle do LKB1, uma quinase serina/treonina supressora de tumor, que ativa a via AMPK em células normais e tumorais possivelmente pela inibição do complexo I. Uma consequência direta dessa ativação é a inibição da via mTor, que desempenha papel fundamental na regulação do crescimento celular, porque regula a tradução de mRNA e a biogênese de ribossomos (BEN SAHRA et al., 2010). Além disso, a AMPK regula a expressão e fosforilação da p53, e sua relação com a metformina ainda está em debate. A atividade da p53 está relacionada com o complexo citocromo c oxidase, essencial para a respiração mitocondrial e utilização de oxigênio para produção de energia. Células com deficiência funcional de p53 apresentam menor consumo de oxigênio pela respiração mitocondrial e aumento da glicólise para produção de energia, contribuindo para o efeito Warburg (BENSAAD; VOUSDEN, 2007).

2.7 CRISTAL VIOLETA

Cristal violeta é um corante básico que se liga à proteínas e ao DNA. É uma técnica sensível e rápida apropriada para análises de citotoxicidade (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986). Essa coloração representa a perda da monocamada celular, já que cora apenas as células aderidas nas placas de cultura celular.

As células mortas perdem a aderência e consequentemente saem da população celular e não são coradas pelo cristal violeta. O ensaio de cristal violeta é sensível e versátil para vários tipos celulares e tratamentos. O método é adequado para o exame de impactos de quimioterápicos e outros compostos na sobrevivência celular e inibição do crescimento (MICKUVIENE; KIRVELIENE; JUODKA, 2004; FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto foi investigar o efeito do dicloroacetato de sódio (DCA) em mastocitomas caninos, por meio da realização de ensaios *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Tratar com diferentes concentrações de dicloroacetato de sódio (DCA) linhagens de mastocitoma canino.
- Investigar os efeitos do tratamento combinado de DCA e omeprazol em linhagens de mastocitoma canino *in vitro*.
- Investigar os efeitos do tratamento combinado de DCA e metformina em linhagens de mastocitoma canino *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 FÁRMACOS

- O Dicloroacetato de Sódio, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Dichloroacetic acid sodium salt, 347795 Aldrich). A solubilização do DCA foi realizada em meio de cultura antes do tratamento das células e submetida à filtração com filtro de porosidade 0,2 micras.
- A metformina (N',N' – dimethylbiguanide) foi adquirida da Sigma Aldrich e diluída em tampão fosfato pH 7,4 em solução estoque de 0,1M, filtrada e mantida a -20°C até o momento do uso.
- O omeprazol foi adquirido da Sigma Aldrich e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em solução estoque de 0,25M, filtrada e mantida a -20°C até o momento do uso.

Os fármacos foram diluídos em meio de cultura, de forma mais concentrada para obter a concentração final desejada após o tratamento das células. O controle para o DCA consistiu do uso de meio de cultura somente. O controle do omeprazol foi feito com dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração equivalente à maior dose do tratamento. O controle da metformina foi feito com tampão fosfato pH 7,4 (PBS), também em concentração equivalente com à maior dose de tratamento. As células foram tratadas após 24h do seu plaqueamento.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

4.2.1 Mastocitoma

As células utilizadas neste trabalho são oriundas do cultivo primário realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia Animal da FMVZ/USP pela Dra. Ivone Izabel Mackowiak da Fonseca em sua tese de doutorado “Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN, proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie canina: estudos ex vivo e in vitro”.

Para estabelecimento das linhagens foram coletadas formações de mastocitomas cutâneos caninos de animais atendidos no Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ/USP) e diagnosticados por meio de citologia aspirativa ou biópsia. Os fragmentos foram mantidos em temperatura ambiente em solução tampão fosfato (PBS) com 2% de antibióticos/antimicótico (200U/mL de penicilina, 200µg/mL estreptomicina e 50µg/mL de anfotericina B, Gibco) até no máximo 30 minutos antes do início da preparação dos cultivos. No laboratório, as amostras de mastocitomas coletadas foram mecanicamente separadas em fragmentos de aproximadamente 1mm, e então submetidos à digestão em solução de collagenase tipo IA de *Clostridium histolyticum* (100U/ml) em meio AIM-V (Gibco) contendo 2% de antibiótico por cerca de 2 horas a 37°C, em banho-maria sob agitação. A suspensão celular resultante foi filtrada com gaze estéril e posteriormente em filtro de 70 µM (Cell Strainer, BD). Todo o conteúdo foi centrifugado a 1200 RPM por 10 minutos e o sobrenadante descartado. As células sedimentadas foram ressuspensas em 5 ml de meio AIM-V suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi, Gibco) e 1% de antibiótico. As células então foram mantidas em estufa umidificada com 5% de CO₂, a 37 °C (FONSECA, 2014).

4.2.2 Linhagens de mastocitoma utilizadas

As linhagens utilizadas foram escolhidas por se proliferarem melhor após o descongelamento. As linhagens intituladas como T17 e T18 foram classificadas como Grau 2 e a T6 como Grau 3.

Quadro 2 - Dados da origem das linhagens de mastocitoma canino utilizadas

Linhagem	Registro clínico	Grau*	Raça	Idade (anos)	Gênero	Localização anatômica
T6	-	3	Boxer	3	Fêmea	Tórax
T17	180651	2	Pit Bull	7	Macho	Tórax
T18	230717	2	Pit Bull	9	Macho	Abdomen lateral

Fonte: (FONSECA, 2014) Adaptado.

*Segundo Patnaik et al., 1984

4.3 CULTIVO CELULAR

O meio utilizado para cultivo das células de mastocitoma foi o AIM V[®] Medium (research grade), AlbuMAX[®] Supplement da ThermoFisher, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico/antimicótico. O processo de inativação do SFB consiste em deixar o soro por 40 minutos a 57°C.

As linhagens celulares de mastocitoma do laboratório estavam congeladas em freezer -80°C ou em galões de nitrogênio líquido. O descongelamento das células de mastocitoma foi realizado da seguinte forma: as células congeladas foram colocadas em um tubo cônico de 15ml. O meio AIM-V foi acrescentado aos poucos de forma crescente a cada 3 minutos até completar 7ml no tubo. Então, o

tubo foi centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Acrescentou-se 1 ml de meio AIM-V para ressuspender as células do *pellet* e o conteúdo foi colocado em garrafas de cultivo, até a tripsinização ou realização do experimento.

O processo de tripsinização foi utilizado para expansão e contagem do número de células para experimentos. Os procedimentos consistiram em descartar o meio da garrafa de cultivo e em seguida lavar as células com PBS/EDTA para retirada do meio de cultura restante, e então incubar na estufa a garrafa por 10 a 15 minutos com 1,5ml de tripsina-EDTA (0,05%)1x. Após o desprendimento das células, a tripsina-EDTA foi inativada pela adição de meio AIM-V contendo SFB. As células foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultivo.

Para a contagem do número de células o sobrenadante do tubo foi descartado após a centrifugação e o *pellet* foi ressuspendido em 1 a 3ml de meio, dependendo do tamanho do *pellet*. Para realização da leitura foram colocados 10µl de meio com célula e 10µl de Azul de Trypan e a contagem feita em contador de células automatizado (Countess, ThermoFisher®).

A coloração com azul de toluidina foi realizada da seguinte maneira: uma gota de meio de cultura com célula foi colocada numa lâmina e após a secagem total da lâmina, esta foi corada com uma gota de azul de toluidina.

As linhagens foram mantidas em cultivo até atingir a quantidade necessária de células ou até o final dos experimentos. O congelamento das células de mastocitomas caninos foi realizado com PVP-40, para aumentar a viabilidade das mesmas após o descongelamento. O processo consistiu em tripsinizar as células, centrifugá-las e ressuspê-las em 500 µl de meio novo. O PVP-40 foi adicionado a cada 15 minutos nas seguintes quantidades: 60 µl, 80 µl, 120 µl e 240 µl. As células foram congeladas em criotubos de 2ml.

4.4 LINHAGENS DE MELANOMA MURINO E CANINO UTILIZADAS COMO CONTROLES

A fim de comparar os resultados obtidos com as células de mastocitomas caninos com outro tipo de tumor, foi utilizada a linhagem B16-F10. Essas são células de melanoma murino C57BL/6J já estabelecidas. Além disso, também foi utilizada as células YAN, linhagem primária de melanoma oral canino estabelecida no laboratório. O meio utilizado para cultivo das células B16-F10 e YAN foi o DMEM alta glicose (Gibco™) suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico.

Os procedimentos para manutenção das células em cultivo foram os mesmos mencionados para as linhagens de mastocitoma, porém com o meio específico dessas células.

4.5 ENSAIO DO CRISTAL VIOLETA

Este ensaio foi utilizado para avaliar a viabilidade celular após os tratamentos. Depois dos tempos de incubação das células em cultura submetidas aos tratamentos, foram adicionados 10µl de cristal violeta 0,5% para cada 100µl de meio/poço. As placas foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e logo em seguida lavadas cuidadosamente com água corrente. O excesso de água foi retirado com papel toalha e a placa deixada para secar naturalmente ao ar livre virada para baixo. Antes de adicionar o cristal violeta foram tiradas fotos para registrar o crescimento das células nos tempos previstos. Depois de totalmente secas foram colocados 100µl/poço de metanol e realizada a leitura em espectrofotômetro (Multiskan EX, Thermo scientific®) a 570 nm.

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

Com a finalidade de avaliar a viabilidade celular após tratamento por outro método, foi realizada citometria de fluxo. Depois da placa ser tratada e incubada por 72 horas a 37°C e 5% CO₂ as células foram tripsinizadas e colocadas em tubos de ensaio próprios de citometria de fluxo. Os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado, e as células foram ressuspensas em 300 µl de PBS com 10 µl de iodeto de propídeo (PI), na concentração de 10ug/ml, e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. As células foram submetidas à leitura em citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson). Para análise dos resultados obtidos, utilizou-se o software Flowjo (TreeStar).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.7.1 Curva de crescimento

Para determinar a concentração de células da linhagem T18 a serem plaqueadas nos experimentos subsequentes foi realizada uma curva de crescimento. Esta consistiu em colocar várias concentrações de células em vários tempos de incubação. Foram preparadas 4 placas de 96 poços com concentrações de 0,5x10⁴; 1,0x10⁴; 1,5x10⁴ e 2,0x10⁴ células/poço em quadruplicatas. As placas foram lidas em 24, 48, 72 e 96 horas pelo ensaio de cristal violeta.

4.7.2 Tempo dos experimentos

Os experimentos foram realizados seguindo o esquema da figura 7. No primeiro dia de experimento as células foram semeadas nas placas e após 24 horas tratadas com os fármacos ou associações específicas de

cada experimento. Os tempos para coloração com cristal violeta foram considerados após o tratamento.

Figura 7 - Delineamento experimental para o tratamento de mastocitoma canino *in vitro*

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

4.7.3 Experimento 1. Tratamento da linhagem T18 com dicloroacetato, omeprazol e metformina isolados

Foi realizado o tratamento da linhagem T18 com DCA, omeprazol e metformina isolados com a finalidade de definir quais concentrações causam efeito no número de células. Foram colocadas $0,8 \times 10^4$ células/poço em 150µl de meio e tratadas com volume de 75µl, 3 vezes concentradas em duas placas de 96 poços para a leituras em 3 e 5 dias. Após 72 horas foram trocados o meio de cultura e o tratamento da placa de 5 dias.

Quadro 3 - Concentrações finais utilizadas no tratamento das células T18

TUBO	DCA (mM)	MET (mM)	OMP (mM)
1	0,315	0,0032	0,0048
2	0,625	0,016	0,019
3	1,25	0,08	0,078
4	2,5	0,4	0,3125
5	5	2	1,25

6	10	10	5
7	20	50	20

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: As concentrações foram obtidas por diluição seriada

4.7.4 Experimento 2. Tratamento da linhagem B16-F10 e células de melanoma canino (YAN) com dicloroacetato, omeprazol e metformina isolados

Para avaliar uma faixa de resposta ao DCA, foi escolhido o melanoma murino B16-F10 como controle, pois experimentos prévios realizados neste laboratório demonstraram suscetibilidade desta linhagem ao tratamento. A linhagem de melanoma oral canino Yan também foi testada. Cada uma das linhagens foi plaqueada com $0,5 \times 10^4$ células/poço em 150µl de meio, em placas de 96 poços. Após 24 horas as placas foram tratadas com volume de 50µl das drogas 4 vezes concentrada. O ensaio com cristal violeta foi realizado em 72 horas.

Quadro 4 - Esquema da placa utilizada para tratamento das células B16-F10 e YAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CT MEIO				CT DMSO 1%				CT PBS20%			
H	50mM				500µM				20mM			
G	20				250				10			
F	10				100				5			
E	5				50				1			
D	1				25				0,5			
C	0,5				10				0,1			
B	0,1				5				BRANCO			
	DCA (mM)				OMEPRAZOL (mM)				METFORMINA (mM)			

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2016)

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CT MEIO				CT PBS 2%				BRANCO				
B	MET 0,02 mM				MET 0,2 mM				MET 2mM				40µl meio + 10µl MET
C													40µl DCA 0,1 + 10µl MET
D													40µl DCA 0,5 + 10µl MET
E													40µl DCA 1 + 10µl MET
F													40µl DCA 5 + 10µl MET
G													40µl DCA 10 + 10µl MET
H													40µl DCA 20 + 10µl MET

C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	BRANCO												
B													50µl meio
C													40µl DCA 0,1 + 10µl meio
D													40µl DCA 0,5 + 10µl meio
E													40µl DCA 1 + 10µl meio
F													40µl DCA 5 + 10µl meio
G													40µl DCA 10 + 10µl meio
H													40µl DCA 20 + 10µl meio

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Placas utilizadas nos experimentos de associações. Tratamentos: (A) DCA + OMP; (B) DCA + MET; (C) DCA isolado para controle.

4.7.6 Experimento 4. Análise de morte celular por Citometria de Fluxo

Este experimento foi realizado com a linhagem T18. Para a realização da citometria é necessária maior quantidade de células, por isso, o tratamento foi realizado em placa de 24 poços. Foram colocadas 1×10^5 células/poço em 500 µl de

meio. Os tratamentos realizados foram com DCA 1mM, 5mM, 20mM e 100mM isolados e em combinação com MET 2mM e OMP 0,1mM. A citometria foi realizada após 72 horas do tratamento.

4.7.7 Experimento 5. Determinação da faixa de resposta das células de mastocitoma canino T6, T17 e T18 ao DCA

Neste experimento foram utilizadas dosagens altas de DCA para verificar sua faixa de atuação nas linhagens T6, T17 e T 18. As concentrações variaram de 10 a 100mM de DCA. Foram plaqueadas $0,5 \times 10^4$ células/poço em quadruplicatas para cada concentração. O ensaio do cristal violeta foi realizado em 3 e 5 dias.

Para o preparo das soluções de DCA 100mM foram pesados 1026,3 mg de DCA, dissolvidos em 17 ml de meio AIM-V e filtrados. As diluições foram realizadas conforme o quadro abaixo (quadro 6).

Quadro 6 – Preparo das soluções para os tratamentos

DCA 1x (mM)	DCA 4x (mM)	DCA400mM (ul)	Meio (ul)
10	40	300	2700
20	80	600	2400
30	120	900	2100
40	160	1200	1800
50	200	1500	1500
60	240	1800	1200
70	280	2100	900
80	320	2400	600
90	360	2700	300
100	400	3000	0

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação entre os tratamentos DCA e associações foi feita utilizando o teste estatístico ANOVA de 2 vias seguida do pós-teste de Bonferroni. A avaliação dos tratamentos em relação ao controle foi feita com a ANOVA de 1 via seguida do pós-teste de Dunnett. Foram considerados com significância estatística quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE MASTOCITOMA

Para a realização dos experimentos foram descongeladas três linhagens de mastocitomas: T6, T17 e T18. Observamos que após 24 horas do descongelamento as células começam a aderir à garrafa de cultivo e crescem em confluência como mostrado na figura 8. Durante o cultivo é possível visualizar uma grande quantidade de grânulos no citoplasma das células. Na figura 9 observamos conteúdo granular intracelular levemente corado em cor púrpura pela coloração de Azul de Toluidina.

Figura 8 - Fotomicrografias das linhagens de mastocitoma canino

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Fotomicrografias das linhagens de mastocitoma canino. Objetiva 10x. (A) Linhagem T16 (B) Linhagem T17 (C) Linhagem T18

Figura 9 - Célula da linhagem T18 corada com azul de toluidina

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Objetiva 100x. Podemos observar, com a coloração de azul de toluidina, os grânulos característicos dos mastócitos corados em púrpura no interior da célula.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

O primeiro passo foi verificar a curva de crescimento da linhagem T18, para avaliar a quantidade de células a ser colocada em cada poço nos experimentos. No gráfico 1 podemos analisar que o crescimento das células a cada 24 horas foi pequeno em todas as concentrações de células, porém com 1×10^4 e $1,5 \times 10^4$ tiveram aumento entre 48 e 72h. Inicialmente foi escolhido 1×10^4 células/poço porque há crescimento no número de células, porém não o suficiente para preencher todo o poço e impedir o crescimento por falta de espaço e levar à morte celular. A figura 10 ilustra a linhagem T18 na concentração de 1×10^4 cels/ml entre 24 e 96 horas.

Gráfico 1 – Curva de crescimento da linhagem T18

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Figura 10 – Fotomicrografia da linhagem T18 corada com cristal violeta na concentração de 1×10^4 cels/ml

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Objetiva 10x. Tempos (A) 24horas (B) 48horas (C) 72horas (D) 96horas

5.3 TRATAMENTO DA LINHAGEM T18 COM DICLOROACETATO, OMEPRAZOL E METFORMINA POR 3 E 5 DIAS

O tratamento da linhagem T18 com os fármacos separadamente foi realizado em placas de 96 poços com o ensaio realizado nos dias 3 e 5. Neste experimento a quantidade de meio e células mostraram-se adequados. O tratamento com DCA (gráfico 2) mostrou aumento na quantidade celular principalmente nas concentrações de 5mM e 10mM, ou seja, ocorreu aumento do número de células e não houve morte celular em nenhuma concentração.

Gráfico 2 - Viabilidade celular em relação ao controle de células T18 tratadas com DCA

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: **p<0,01; *** p <0,001.

O gráfico 3 mostra a viabilidade células após o tratamento com metformina. A leitura no dia 3 apresentou diferença significativa apenas na concentração de 0,016mM, porém no dia 5 mostrou diminuição da concentração 0,016mM até 50mM.

Gráfico 3 - Viabilidade celular em relação ao controle de células T18 tratadas com MET

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

O tratamento com omeprazol mostrou diminuição da viabilidade celular apenas na maior concentração de 20mM no ensaio realizado no quinto dia após o

tratamento, lembrando que o meio de cultivo e o tratamento foram trocados após 72 horas. As demais concentrações estimularam o crescimento celular (gráfico 4).

Gráfico 4 - Viabilidade celular em relação ao controle de células T18 tratadas com OMP

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.4 TRATAMENTO DA LINHAGEM B16-F10 E CÉLULAS DE MELANOMA CANINO (YAN) COM DICLOROACETATO, OMEPRAZOL E METFORMINA

Como o tratamento com DCA, metformina e omeprazol mostrou estímulo ao crescimento celular mesmo em altas concentrações na linhagem T18 de mastocitoma canino, os experimentos foram repetidos com outro tipo celular de tumor e o ensaio com cristal violeta foi realizado após 72 horas. Foi utilizado a linhagem de melanoma murino B16-F10 como comparativo, pois esta linhagem se mostrou sensível ao tratamento em trabalhos prévios realizados neste laboratório. A linhagem primária de melanoma oral canino YAN também foi testada.

O tratamento com DCA mostrou diminuição na viabilidade celular a partir da concentração de 10mM na linhagem B16-F10 e a partir de 20mM na linhagem Yan (gráfico 5) tratadas por 72 horas.

Gráfico 5 - Viabilidade celular em relação ao controle de células de melanoma canino tratadas com DCA

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

O gráfico 6 representa o tratamento com omeprazol, as linhagens de melanoma mostraram aumento de viabilidade celular em doses mais baixas, sendo que ocorreu maior aumento na B16-F10 nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 μ M. Já na concentração de 250 e 500 μ M ocorreu significativa queda da viabilidade celular em relação ao controle.

Gráfico 6 - Viabilidade celular em relação ao controle de células de melanoma canino tratadas com OMP

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

O tratamento com metformina não apresentou diferença significativa nas células YAN, porém na linhagem B16-F10 ocorreu diminuição da viabilidade celular nas concentrações de 1, 10 e 20mM (gráfico 7).

Gráfico 7 - Viabilidade celular em relação ao controle de células de melanoma canino tratadas com MET

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)
 Legenda:; **p<0,01; *** p <0,001.

5.5 ASSOCIAÇÕES ENTRE DICLOROACETATO, OMEPRAZOL E METFORMINA

5.5.1 Tratamento da linhagem B16-F10

Para verificar os efeitos da associação DCA + metformina e DCA + omeprazol foi utilizada novamente a linhagem B16-F10 com a finalidade de comparar os resultados obtidos com as linhagens de mastocitomas caninos. As curvas de resposta das associações foram comparadas à curva de resposta do tratamento com DCA isolado. A figura 11 representa o tratamento isolado do DCA, MET e OMP, sendo que a viabilidade celular diminui com o tratamento nas concentrações de 10 e 20mM. A concentração de 0,5mM de OMP mostrou-se altamente tóxica e inviabilizou todas as células tratadas.

Figura 11 - Viabilidade celular da linhagem B16.F10 após o tratamento com DCA, MET e OMP isolados

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Viabilidade celular após o tratamento com (A) DCA (B) MET (C) OMP: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Podemos analisar pelo gráfico 8 que a associação DCA + metformina 2mM mostrou diminuição marcante da viabilidade celular quando comparada ao tratamento com DCA isolado. Porém, observando o tratamento com a metformina sem o DCA (figura 11 - B), já se nota a diminuição de viabilidade em relação ao controle mesmo quando o tratamento é realizado apenas com a concentração de metformina de 2mM sem o DCA.

Gráfico 8 - Tratamento de células da linhagem B16 - F10 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72 horas

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

*p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

No gráfico 9 também vemos que a diminuição da viabilidade celular ocorre nas concentrações de 10 e 20mM de DCA, porém a associação teve mais efeito com a combinação de 2mM de metformina e 20m de DCA.

Gráfico 9 - Tratamento de células da linhagem B16-F10 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

A combinação entre o dicloroacetato e o omeprazol foi a que apresentou melhor resultado em relação a morte celular. O omeprazol na concentração de

0,5mM mesmo sem a combinação com o DCA já diminui totalmente a viabilidade celular, mostrando-se altamente tóxica. Tanto em 3 dias quanto em 5 vemos que a associação entre 10mM de DCA com 0,02mM/0,1mM de OMP e 20mM de DCA com 0,02mM/0,1mM de OMP diminuem mais a viabilidade celular do que o DCA isoladamente (gráficos 10 e 11).

Gráfico 10 - Tratamento de células da linhagem B16-F10 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 3 dias

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Gráfico 11 - Tratamento de células da linhagem B16-F10 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

As figuras (12, 13, 14, 15, 16 e 17) abaixo mostram a linhagem B16.F10 após a coloração com cristal violeta em diferentes tempos e concentrações. Assim como vimos nos gráficos, as figuras mostram a diminuição do número de células em relação ao controle.

Figura 12 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Controle do tratamento com MET 2mM*

Figura 13 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Células tratadas com combinação de 2mM MET e 10 mM de DCA*

Figura 14 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Controle do tratamento com OMP 0,1mM*

Figura 15 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 3 dias. Células tratadas com combinação de 0,1mM OMP + 5 mM de DCA*

* Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Células coradas com cristal violeta. Objetiva de 10 x.

Figura 16 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 5 dias. Controle com DMSO*

Figura 17 - Células B16.F10 coradas com cristal violeta. Leitura de 5 dias. Células tratadas com 0,02mM OMP + 20 mM de DCA*

* Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Células coradas com cristal violeta. Objetiva de 10 x.

5.5.2 Tratamento da linhagem T18

Diferentemente da linhagem de melanoma B16-F10 observamos que o mastocitoma T18 não respondeu favoravelmente à metformina combinada ao DCA, sendo que a maior dose de metformina (2mM) causou um aumento expressivo no crescimento celular. Assim como o tratamento com DCA sozinho, a combinação com metformina resultou em estímulo ao crescimento celular tanto em 3 quanto em 5 dias (gráficos 12 e 13). A figura 18 mostra que o tratamento das células de mastocitoma T18 com a metformina isolada apresenta melhor efeito inibitório nas 3 dosagens testadas (0,02mM, 0,2mM e 2mM) no tempo de 3 dias, efeito este que é perdido quando associado ao DCA (gráfico 12).

Figura 18 - Tratamento de células de mastocitoma T18 com omeprazol e metformina isolados

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Tratamento de células de mastocitoma T18 com (A) MET isolada (B) OMP isolado

Gráfico 12 - Tratamento das células da linhagem T18 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72 horas

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: **p<0,01; *** p <0,001.

Gráfico 13 - Viabilidade celular das células T18 após tratamento com combinação de DCA e MET: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *** $p < 0,001$.

Como a concentração de 0,5mM de omeprazol é muito alta e mostrou-se muito tóxica no tratamento da linhagem B16-F10, a concentração mais alta utilizada de omeprazol foi de 0,2mM para o tratamento dos mastocitomas. Como se pode observar na figura 18 o omeprazol 0,02mM e 0,1mM tiveram mais efeito isolados do que combinados com o DCA. Surpreendentemente mesmo quando combinado com o DCA nas concentrações mais altas (10mM e 20mM) o omeprazol causou aumento de viabilidade celular. Como podemos analisar pelos gráficos 14 e 15 o tratamento apenas com DCA 10mM tem o mesmo efeito que a combinação com 0,2mM de omeprazol.

Gráfico 14 - Tratamento da combinação entre DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72 horas.

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

Gráfico 15 - Tratamento da combinação entre DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias.

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

As figuras 19 a 24 ilustram as células da linhagem T18 coradas com o cristal violeta. Comparando as fotomicrografias das figuras 19 e 22 que são controles de células não tratadas, com as figuras 20, 21, 23 e 24 vemos que realmente não

ocorreu diminuição na população celular mesmo quando foram submetidas ao tratamento.

Figura 19 - Fotomicrografia da linhagem T18. Controle sem tratamento após 3 dias*

Figura 20 - Fotomicrografia da linhagem T18 após três dias de tratamento com 10mM de DCA e 2mM de MET*

Figura 21 - Fotomicrografia da linhagem T18 após três dias de tratamento com 20mM de DCA e 0,02mM de OMP*

Figura 22 - Fotomicrografia da linhagem T18. Controle sem tratamento após 5 dias*

Figura 23 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 5 dias de tratamento com 10mM de DCA*

Figura 24 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 5 dias de tratamento com a combinação de 10mM de DCA e 0,2mM de OMP*

* Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Células coradas com cristal violeta. Objetiva de 10 x.

5.5.3 Tratamento da linhagem T6

Os resultados de combinações entre dicloroacetato com metformina e omeprazol na linhagem T6 foram semelhantes aos da linhagem T18. Tanto em 3 quanto em 5 dias o tratamento com o DCA isolado não teve diferença na viabilidade celular quando comparado ao controle sem tratamento. Os gráficos 16 e 17 reafirmam que não ocorreu diferença entre células não tratadas e células tratadas com 20mM de DCA.

Quando combinados com metformina as concentrações de 0,02mM e 0,2mM tiveram aumento do número de células com 5mM, 10mM e 20mM de DCA. Na figura 25-A podemos verificar que mesmo o tratamento da metformina isolada nas concentrações de 0,02 e 0,2mM no quinto dia de tratamento ocorre aumento da viabilidade celular.

Figura 25 - Tratamento de células de mastocitoma T6 com omeprazol e metformina isolados

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

Gráfico 16 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72 horas

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

Gráfico 17 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e MET comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

A combinação entre o dicloroacetato com o omeprazol apresentou uma pequena diminuição da viabilidade celular nas menores concentrações de DCA com 0,2mM de OMP. Na figura 25-B já observamos que nas concentrações de 0,1 e 0,2 o OMP como tratamento isolado já causa a perda da viabilidade. O maior pico de aumento do número de células no ensaio de cristal violeta realizado no terceiro dia

foi na associação entre o omeprazol e 10mM de DCA (gráficos 18), já no quinto dia foi na associação com 20mM de DCA (gráfico 19).

Gráfico 18 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 72 horas

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; *** p <0,001.

Gráfico 19 - Tratamento das células da linhagem T6 com a combinação de DCA e OMP comparados com o tratamento de DCA isolado: ensaio cristal violeta realizado em 5 dias

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: *p<0,05; **p<0,01; *** p <0,001.

Figura 26 - Fotomicrografia após 72 horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Controle.*

Figura 27 - Fotomicrografia após 72 horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com 20mM de DCA*

Figura 28 - Fotomicrografia após 72 horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com combinação de 0,02mM de MET e 20mM de DCA*

Figura 29 - Fotomicrografia após 72 horas da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com combinação de 0,1mM de OMP e 20mM de DCA*

Figura 30 - Fotomicrografia após 5 dias da linhagem T6 corada com cristal violeta. Controle.*

Figura 31 - Fotomicrografia após 5 dias da linhagem T6 corada com cristal violeta. Células tratadas com combinação de 0,1mM de OMP e 20mM de DCA.*

* Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Células coradas com cristal violeta. Objetiva de 10 x

5.6 ANÁLISE DA MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

O experimento entre combinação de dicloroacetato com metformina e omeprazol foi realizado novamente com a linhagem T18 e as mesmas concentrações acrescida a de 100mM de DCA, porém neste a análise de morte celular foi feita por citometria de fluxo pela marcação com Iodeto de Propídio.

Assim como nos outros experimentos a morte celular foi baixa e apenas com a concentração de 100mM de DCA a porcentagem de morte foi extremamente elevada.

Gráfico 20 - Percentual de células mortas analisada por citometria de fluxo

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: * $p < 0,05$.

Abaixo estão representadas as imagens da citometria de fluxo sendo que a figura 32 mostra as células controle sem tratamento dentro do *gate* escolhido para análise das amostras. A figura 33 representa o tratamento com 100mM de dicloroacetato em que há aproximadamente 76% de morte celular.

Figura 32 – Controle de células coradas com iodeto de propídeo) PI*

Figura 33 - Morte das células coradas com PI, submetidas ao tratamento de 100mM de DCA*

Figura 34 – Morte basal das células das células coradas com PI, submetidas ao tratamento de 20mM de DCA*

Fonte: Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Para a realização da citometria é necessário maior número de células e por isso foram colocadas 1×10^5 células/poço em 500 μ l de meio. Como podemos verificar na figura 35, no terceiro dia a confluência das células já era muito grande principalmente no centro do poço formando até aglomerados de células. Assim como já vimos anteriormente mesmo a combinação de tratamentos não teve

resultado, na figura 36 vemos que a associação de 20mM de DCA e 2mM de MET tem grande quantidade de células confluentes formando os grumos celulares.

Figura 35 - Fotomicrografia da linhagem T18 no experimento para análise por citometria de fluxo. Controle sem tratamento após 72h

Figura 36 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 72h após o tratamento com a combinação de 20mM de DCA e 2mM de MET

* Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Células com cristal violeta. Objetiva de 10 x

A figura 37 mostra as células após 3 dias do tratamento com 100mM de dicloroacetato. Como podemos analisar as células estão com tamanho reduzido, redondas e não aderidas, mostrando que realmente houve morte celular.

Figura 37 - Fotomicrografia da linhagem T18 após 72h do tratamento com a combinação de 100mM de DCA

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: Células com cristal violeta. Objetiva de 10 x

5.7 FAIXA DE RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MASTOCITOMA CANINO T6, T17 E T18 AO DCA

Com a análise por citometria de fluxo verificou-se que na concentração de 100mM ocorreu uma alta porcentagem de morte celular. No próximo passo o tratamento foi realizado nas concentrações de 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM e 100mM em três linhagens: T6, T17 e T18.

Os resultados obtidos por meio do ensaio com cristal violeta em todas as linhagens não correspondem ao que foi visto nas garrafas de cultivo pelo microscópio invertido. A partir da concentração de 50mM ocorreu acentuada queda no número de células e aumento de debris e restos celulares. Nas linhagens T6, T17 e T18 os resultados da densidade óptica não mostrou uma redução parecida com o que foi visto ao microscópio, porém como podemos observar a densidade foi baixa o que pode ter levado a uma leitura errada, assim como os restos celulares que podem ter ficado aderidos às placas.

O gráfico 21 mostra que em 3 dias as concentrações de 10mM a 80mM a viabilidade celular foi maior do que quando comparadas as células controle sem tratamento. Já em 5 dias de 50mM a 100mM viabilidade foi menor, ou seja, ocorreu maior morte celular, porém o tratamento com concentração de 100mM não teve diferença estatística quando comparada com o controle de células não tratadas.

Gráfico 21 - Tratamento da linhagem T17 com diversas concentrações de DCA após 72h*

Gráfico 22 - Tratamento da linhagem T17 com diversas concentrações de DCA após 5 dias*

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

*Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O mesmo ocorreu com a linhagem T18, em 3 dias ocorreu aumento de viabilidade a partir da concentração de 30mM e em 5 dias ocorreu expressiva queda entre 40mM e 70mM. Em ambas as leituras as concentrações de 90mM e 100mM mantiveram-se como o controle (gráficos 23 e 24). Além disso, nota-se que mesmo as células controle não tiveram tanto crescimento de 3 para 5 dias.

Gráfico 23 - Tratamento da linhagem T18 com diversas concentrações de DCA após 72h*

Gráfico 24 - Tratamento da linhagem T18 com diversas concentrações de DCA após 5 dias*

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

*Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A linhagem T6 apresentou uma queda estatisticamente significativa apenas na leitura realizada após 5 dias de tratamento e a partir da concentração de 50mM (gráfico 26).

Gráfico 25 - Tratamento da linhagem T6 com diversas concentrações de DCA após 72h*

Gráfico 26 - Tratamento da linhagem T6 com diversas concentrações de DCA após 5 dias*

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

*Legenda: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Na linhagem T6 podemos observar pelas figuras 38 e 39 que a partir da concentração de 60mM ocorre diminuição no número de células, principalmente no quinto dia de tratamento. Na figura 38-F podemos ver uma perda significativa no número de células.

Com a linhagem T17 ocorre uma diminuição no número de células de maneira similar à T6. Na figura 40 e 41 podemos ver que também a partir da concentração de 60mM o número de células diminui. Sendo que no quinto dia após o tratamento vemos essa diminuição a partir de 50mM (Figura 41-F).

Na linhagem T18 o número de células na figura representativa do controle (Figuras 42-A e 43-A) já podemos ver que o número total de células já foi menor que das outras linhagens. No terceiro dia pós tratamento vemos uma diferença significativa principalmente a partir de 80mM (Figura 42 I). Porém, no quinto dia pós tratamento essa diferença já é marcante a partir de 40mM (Figura 43-E).

Figura 38 – Fotomicrografia no terceiro dia de tratamento da linhagem T6 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: (A) Controle. As concentrações de DCA foram (B) 10mM (C) 20mM (D) 30mM (E) 40mM (F) 50mM (G) 60mM (H) 70mM (I) 80mM (J) 90mM (K) 100mM

Figura 39 - Fotomicrografia no quinto dia de tratamento da linhagem T6 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: (A) Controle. As concentrações de DCA foram (B) 10mM (C) 20mM (D) 30mM (E) 40mM (F) 50mM (G) 60mM (J) 70mM (I) 80mM (J) 90mM (K) 100mM

Figura 40 – Fotomicrografia no terceiro dia de tratamento da linhagem T17 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: (A) Controle. As concentrações de DCA foram (B) 10mM (C) 20mM (D) 30mM (E) 40mM (F) 50mM (G) 60mM (J) 70mM (I) 80mM (J) 90mM (K) 100mM

Figura 41 - Fotomicrografia no quinto dia de tratamento da linhagem T17 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: (A) Controle. As concentrações de DCA foram (B) 10mM (C) 20mM (D) 30mM (E) 40mM (F) 50mM (G) 60mM (H) 70mM (I) 80mM (J) 90mM (K) 100mM

Figura 42 - Fotomicrografia no terceiro dia de tratamento da linhagem T18 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: (A) Controle. As concentrações de DCA foram (B) 10mM (C) 20mM (D) 30mM (E) 40mM (F) 50mM (G) 60mM (H) 70mM (I) 80mM (J) 90mM (K) 100mM

Figura 43 - Fotomicrografia no terceiro dia de tratamento da linhagem T18 tratadas com diversas concentrações de DCA e coradas com cristal violeta

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: (A) Controle. As concentrações de DCA foram (B) 10mM (C) 20mM (D) 30mM (E) 40mM (F) 50mM (G) 60mM (J) 70mM (I) 80mM (J) 90mM (K) 100mM

5.8 RESUMO DOS RESULTADOS

Com a finalidade de resumir e simplificar os dados obtidos, os quadros abaixo possuem os mesmos resultados apresentados nos gráficos.

Quadro 7 - Resultados do tratamento com DCA em linhagens T18 e T6

RESULTADOS DCA ISOLADO CÉLULAS T 18	
Tratamento da T18 com dicloroacetato, omp e met	
3 dias	aumento com 10mM
5 dias	aumento com 5, 10 e 20mM
Associações	
3 dias	aumento com 10 e 20mM
5 dias	aumento com 20mM
RESULTADOS DCA ISOLADO CÉLULAS T 6	
Associações	
3 dias	sem diferença estatística
5 dias	sem diferença estatística

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Quadro 8 - Resultados do tratamento com MET em linhagens T18 e T6

Resultado Tratamento com MET isolada				
Tratamento da linhagem T18 com dicloroacetato, omeprazol e metformina				
3 dias	sem resultado			
5 dias	Diminuição com 0,016, 0,08, 0,4, 10 e 50 mM			
Associações				
	T18 3 dias	T18 5 dias	T6 3 dias	T6 5dias
Met 0,02	a	a	a	a
Met 0,2	a	a	a	*
Met2	a	a	a	a

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

Legenda: a – sem diferença estatística; : *p<0,05;

Quadro 9 - Resultados do tratamento com OMP em linhagens T18 e T6

Resultado Tratamento com OMP isolado				
Tratamento da linhagem T18 com dicloroacetato, omeprazol e metformina				
3 dias	aumento com 0,048; 0,019; 0,078; 0,3125 e 1,25mM			
5 dias	aumento com 0,048; 0,019; 0,078; 0,3125mM			
	diminuição com 20mM			
Associações				
	T18 3 dias	T18 5 dias	T6 3 dias	T6 5dias
Omp 0,02	**	a	a	a
Omp 0,1	a	a	a	a
Omp0,2	a	a	a	a

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017).

Legenda: a – sem diferença estatística; : **p<0,01

Quadro10 – Resultado das associações DCA + MET e DCA + OMP em linhagens T 18 e T6

Resultado Tratamento DCA + MET, DCA + OMP		
	T18 3 dias	T18 5 dias
Met 0,02	Aumento 10 e 20mM DCA	Aumento 10 e 20mM DCA
Met 0,2	Aumento 10 e 20mM DCA	Aumento 10 e 20mM DCA
Met2	Aumento 10 e 20mM DCA	Aumento 10 e 20mM DCA
Omp 0,02	Diminuição 0,1mM Aumento 20mM	Aumento 0,5; 5, 10 e 20mM
Omp 0,1	Aumento 10 e 20mM DCA	Aumento 10 e 20mM DCA
Omp0,2	Aumento 5; 10 e 20mM DCA	Aumento 10 e 20mM DCA
	T6 3 dias	T6 5 dias
Met 0,02	Aumento 10mM DCA	Aumento 20mM DCA
Met 0,2	Aumento 20mM	Aumento 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20mM
Met2	sem diferença	Aumento 5 e 10mM
Omp 0,02	Aumento 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20mM	Aumento 20mM DCA
Omp 0,1	Aumento 5 e 10mM DCA	Aumento 20mM DCA
Omp0,2	sem diferença	sem diferença

Fonte: (Olivato, M. C. M., 2017)

6. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos em vários países têm mostrado que a incidência de novos casos de neoplasias em animais domésticos vem aumentando. Alguns levantamentos já foram realizados em diversos países, como na Dinamarca onde a proporção de morte por câncer em cães foi de 14,5% (PROSCHOWSKY; RUGBJERG; ERSBOLL, 2003), 16% na Inglaterra (MICHELL, 1999) e 27,3% na Alemanha (EICHELBURG; SEINE, 1996). No Brasil, os dados sobre epidemiologia do câncer em cães e gatos provêm de estudos pontuais e sem padronização, por isso, são pouco representativos (TEDARDI, 2014).

Um estudo demonstrou que em São Paulo a expectativa de vida dos cães é de apenas 36 meses, sendo as doenças infecciosas a principal causa de morte, seguida de neoplasias com 13,28% (BENTUBO et al., 2007). Kimura et al, (2012) realizaram um estudo retrospectivo analisando biópsias e necropsias feitas no Serviço de Patologia Animal da FMVZ/USP entre 1993 e 2002 e viram que as neoplasias mais comuns em cães foram os adenocarcinomas mamários e mastocitomas. Pesquisas mais recentes corroboram esses dados. No período de 2000 a 2007 foram diagnosticados 260 casos de mastocitomas por exame histopatológicos no Hospital Veterinário da FMVZ/USP (COSTA-CASAGRANDE, T.A.; ELIAS, D.S.; MELO, S.R.; MATERA, 2008) e outro realizado na Universidade Federal de Santa Maria avaliaram 761 tumores de cães dos quais 20,9% eram mastocitomas (SOUZA et al., 2006).

O tratamento de escolha para mastocitomas caninos é a cirurgia para excisão do tumor e mostra-se mais eficiente para tumores de grau 1 e 2 em que os tumores estão confinados na pele e subcutâneo, sem metástases (MISDORP, 2004). Nos casos em que o tumor não pode ser totalmente excisado na cirurgia, seja pelo tamanho do tumor ou local de difícil acesso, pode-se recorrer à quimioterapia e radioterapia (WITHROW; VAIL; PAGE, 2013). Um estudo avaliou o uso pós cirúrgico de prednisona e vimblastina, demonstrando que a sobrevida dos cães foi de 1374 dias (THAMM; TUREK; VAIL, 2006). Já, um segundo estudo mostrou que cães submetidos ao tratamento com a combinação de prednisona, lomustina e

vimblastina tiveram uma sobrevida global de 48 semanas (COOPER; TSAI; BENNETT, 2009).

Vale lembrar que a maioria dos medicamentos utilizados em medicina veterinária são redirecionados do uso humano, não sendo desenvolvidos especificamente para os animais. Por isso, a busca por um tratamento mais efetivo para os animais é tão importante, principalmente para doenças como o mastocitoma, a neoplasia mais comum em cães, porém que não acomete os humanos.

Tradicionalmente o desenvolvimento de tratamentos em oncologia se concentram em atingir alvos que são essenciais para a sobrevivência de todas as células, tumorais ou não, e essa limitação causa maiores efeitos colaterais aos pacientes. Uma abordagem que tem mostrado eficácia limitada, porém que é alvo de estudos, são terapias que usem vias essenciais apenas para as células cancerígenas (SUTENDRA; MICHELAKIS, 2013). Um exemplo é o uso de Trastuzumab, que aumenta os benefícios da quimioterapia de primeira escolha em pacientes com tumor de mama que possuem superexpressão do receptor tipo 2 do *fator de crescimento* epidérmico humano (HER2). Isto porque o anticorpo utilizado de liga diretamente ao HER2 sem causar maiores danos as células normais (SLAMON et al., 2001).

Uma característica de alguns tipos tumorais é o efeito Warburg. Células normais do organismo, na presença de oxigênio, têm preferência por gerar energia por meio da fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria, que gera 36 ATPs. A primeira etapa é a glicólise que ocorre no citoplasma das células, que culmina com a formação do piruvato e liberação de elétrons e íons H^+ . Estes elétrons e íons são capturados por moléculas NAD^+ que são aceptoras de elétrons, formando duas moléculas NADH. Essa reação produz NADH que fornece combustível para a oxidação fosforilativa, fase em que acontece a maior produção de ATP, com uma mínima produção de lactato (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; SUTENDRA; MICHELAKIS, 2013). O piruvato entra na mitocôndria, onde reage com a coenzima A, dando origem a duas moléculas de gás carbônico e duas de Acetil-CoA. No ciclo de Krebs a Acetil-CoA é degradada e também originam

moléculas NADH e FADH₂. Ocorre então a fosforilação oxidativa que forma 36 moléculas de ATP utilizando a energia liberada dos elétrons durante sua passagem pela cadeia respiratória (ALBERTS et al., 2006; MARZZOCO; TORRES, 2007; MARIE; SHINJO, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRA, 2012)

O efeito Warburg também é chamado de glicólise aeróbica porque apesar da célula estar na presença de oxigênio, o piruvato não entra na mitocôndria, pois a PDH é bloqueada pela PDK1 e seu metabolismo é desviado para a produção de lactato. (GATENBY; GILLIES, 2007; MARIE; SHINJO, 2011). A dependência da via glicolítica para geração de ATP das células tumorais é uma importante diferença metabólica entre células normais e tumorais, e tem sido alvo de estudo para desenvolver uma terapia que utilize esta diferença bioquímica como estratégia para ter como alvo preferencialmente as células tumorais (CHEN et al., 2007).

O principal alvo do dicloroacetato de sódio é o complexo piruvato desidrogenase presente nas mitocôndrias. O DCA inibe a PDK, e assim, este fármaco tem o poder de manter o CPD e facilita a fosforilação oxidativa e o ciclo de Krebs na mitocôndria (DUNBAR et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do dicloroacetato de sódio no tratamento de mastocitomas caninos *in vitro*. O dicloroacetato é uma nova promessa no tratamento de vários tipos tumorais. O Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ/USP possui resultados que confirmam a eficácia do DCA em alguns tipos de tumores *in vitro*, como em linhagens de tumor mamário humano MCF-7, tumor mamário canino, células tumorais pulmonares murinas, osteossarcoma canino e melanoma murino e canino (resultados ainda não publicados). Vale ressaltar que a diminuição da viabilidade celular ocorreu em tempos e concentrações diferentes para cada linhagem celular, mesmo dentro do mesmo tipo de tumor.

O tratamento das linhagens de mastocitoma surpreendeu ao revelar uma resposta de estímulo ao crescimento do número de células, contrariando também dados da literatura que apresentam resultados favoráveis do tratamento com dicloroacetato em outros tipos tumorais. Em linhagens de câncer endometrial, a maioria das linhagens responderam na concentração de 10mM de DCA (WONG et

al., 2008). Nas células de tumor colorretal, algumas linhagens também tiveram sua viabilidade diminuídas a partir de 20mM (MADHOK et al., 2010; DELANEY et al., 2015). Sun et al, (2010) viram que em linhagens de tumor de mama o melhor resultado foi após 4 dias de tratamento em células MAT tratadas com 5mM de DCA, que mostraram aproximadamente 68% menos células que o controle. Já em linhagens de carcinoma oral os melhores resultados foram com 10mM (RUGGIERI et al., 2015). Os efeitos do DCA também já foram testados em células de linhagem canina (HARTING et al., 2016). Três linhagens de adenocarcinomas prostáticos caninos (DT08/46, CT1258, DT15/08) e três linhagens de carcinomas de células de transição também caninos (DT08/40, DT15/06, DT15/09) foram tratadas com concentração de 10mM de DCA e tiveram redução no número de células quando comparadas com controles. Observou-se redução do Ki-67, porém não aumento de apoptose como já foi demonstrado em outros estudos (BONNET et al., 2007; WONG et al., 2009; HARTING et al., 2016).

Os estudos acima têm em comum o fato de terem sido feitos utilizando neoplasias de origem epitelial. Na verdade, estudos realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada (Proc. FAPESP 2014/ 04819-7) investigando diversos tipos celulares demonstraram haver efeitos inibitórios do DCA sobre células epiteliais mamárias caninas e humanas, mas também demonstraram efeitos inibitórios sobre melanoma murino B16F10 e melanomas caninos, além de osteossarcomas caninos (em fase de elaboração)¹.

Pudemos observar ao longo deste estudo que o DCA nas menores concentrações testadas de 0,031mM a 20mM não reduziu o número de células nas linhagens de mastocitoma (T6, T17 e T18), ao contrário do que era esperado, tendo aumentado a viabilidade celular, principalmente nas concentrações de 5mM a 20mM. Com a finalidade de detectar se alguma falha técnica pudesse estar influenciando o resultado, os mesmos experimentos foram repetidos com linhagens

¹ Resultados do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da FMVZ/USP.

de melanoma murino transplantável (B16-F10) e oral canino (YAN) e observou-se que neste caso ocorre morte celular, provando a integridade do método.

Além disso, a citometria de fluxo foi realizada para identificar a morte celular por outro método e comprovar os resultados obtidos com o cristal violeta. Vimos que nas menores doses isoladas ou em associação a porcentagem de morte celular foi baixa, sem diferença em relação ao controle de células não tratadas. Neste experimento, as células tiveram aproximadamente 76% de morte celular na concentração de 100mM de DCA isolado ou em combinação. A partir deste dado observamos uma faixa de resposta das linhagens de mastocitoma canino, em que até 10/20mM ocorre aumento da viabilidade celular e com 100mM apenas 25% das células sobrevivem.

Para encontrar a partir de qual concentração o DCA começa a diminuir o número de células viáveis foi realizado o tratamento das três linhagens de mastocitoma canino com concentrações de 10mM a 100mM. Observando as placas ao microscópio, pudemos observar que a partir de 60mM todas as linhagens apresentaram diminuição da viabilidade celular, que se acentuou até a concentração de 100mM. Porém, com o ensaio do cristal violeta os resultados obtidos na densidade óptica foram discrepantes com o que foi observado. Com o aumento do número de células mortas também ocorreu aumento de restos e debris celulares, como podemos observar nas figuras 37 a 42. Por isso, acredita-se que o ensaio do cristal violeta não foi um método eficaz para essa avaliação, porque esses debris celulares podem ter se aderido à placa, terem sido corados e lidos como células viáveis.

Nos testes realizados, não foi possível calcular a concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo (IC_{50}) do DCA nas linhagens de mastocitoma, pois, como foi dito anteriormente não ocorreu morte celular até 20mM e os resultados numéricos do experimento das concentrações de 10mM a 100mM não foram fidedignos com o que foi observado. Foi reportado que em linhagens celulares de tumores mamários humanos, o IC_{50} situa-se entre 20 e 30mM (L. KO, 2009), e em doses mais baixas como 0,5 - 10mM em linhagens de neoplasias de origem

endometrial e pulmonar (BONNET et al., 2007; WONG et al., 2009; SUN et al.). Em linhagem de tumor colorretal também foi relatada eficácia do DCA entre 20 - 50mM, mostrando-se incompatível com o tratamento *in vivo* porque a dose de DCA necessária para atingir as concentrações plasmáticas seria cerca de cinco a dez vezes superior à utilizada em ensaios clínicos contra a acidose láctica (MADHOK et al., 2010). Assim como foi observado por Madhok (2010) em tumor colorretal, também acredita-se que o tratamento *in vivo* com DCA em mastocitomas caninos seja inviável.

O efeito conhecido como hormese, considera um processo em que a exposição a uma dose baixa de um agente químico ou ambiental pode ter um fator benéfico adaptativo da célula ou organismo, enquanto em altas doses é tóxico (MATTSON, 2009). Vimos que a resposta do DCA nas células de mastocitoma canino talvez possa ser atribuída ao efeito hormese, já que em altas concentrações mostrou alta porcentagem de morte celular, enquanto em até 20mM mostrou aumento da viabilidade.

Num estudo conduzido por Calabrese, 2005, foi observado que baixas doses de agentes tumorais comumente aumentam a proliferação das células tumorais (CALABRESE², 2005 appud CALABRESE, 2008). Foi reportado o efeito hormese em 138 linhagens celulares *in vitro* induzidas por 120 agentes antineoplásicos. Por exemplo, o tratamento com 0,1mg/ml de Suramin estimula células de linhagem de tumor mamário humano.

Diferentemente dos outros tipos de tumores nos quais o DCA foi testado (pulmão, mama, colorretal, próstata) o mastocitoma canino é composto por células do sistema imunológico, o mastócito. A característica morfológica mais distintiva dos mastócitos são seus grânulos secretórios elétron-densos que ocupam grande parte do citoplasma (WERNERSSON; PEJLER, 2014). Os mastócitos são células inflamatórias de origem hematopoética, que respondem aos sinais de imunidade inata e adaptativa com liberação de mediadores inflamatórios. Têm papel central na

² Calabrese EJ. Cancer biology and hormesis: human tumor cell lines commonly display hormetic (biphasic) dose responses. Crit Rev Toxicol. 2005;35:463–582.

patogênese de doenças de hipersensibilidade imediata e de mastocitose, mas também estão presentes em respostas de hospedeiros à patógenos, doenças auto-imunes, fibrose e cicatrização de feridas (STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2011).

Como o DCA atua nas mitocôndrias, procuramos verificar se há na literatura algum estudo descrevendo o metabolismo mitocondrial em mastócitos caninos e em mastocitomas. Verificamos que não há estudos cito-fisiologia dos mastócitos neoplásicos, e, portanto, procuramos artigos referentes a mastócitos de outras espécies. Bloom (1958) estudou os mastócitos presentes no mastocitoma murino por microscopia eletrônica, utilizando a linhagem P-815 obtida de camundongos DBA/2 após tratamento local na pele com metilcolantreno. Ao microscópio eletrônico foi observado que as mitocôndrias são bastante numerosas no citoplasma e não raro, foram observadas algumas alterações estruturais. Essas mudanças foram caracterizadas como perda parcial da estrutura interna ou o contrário, aumento das estruturas lamelares. Já os estudos de Smith (1963) (SMITH, D. E.³, 1963 apud KALINER; AUSTEN, 1974) envolvendo mastócitos humanos, demonstraram haver baixo número de mitocôndrias nessas células. Salvo maior juízo, não encontramos artigos que descrevam as características metabólicas dos mastócitos neoplásicos de cães, e devido a este fato, tornou-se difícil discutir o modo de ação e os mecanismos que levaram aos resultados obtidos neste estudo.

As células tumorais possuem outras características peculiares além da baixa produção de ATP. O microambiente tumoral além de hipóxico é mais ácido, o que contribui para a progressão maligna do câncer. O meio mais ácido, particularmente, contribui para a resistência aos quimioterápicos, proliferação e comportamento metastático. O pH é mantido pela atividade da enzima V-ATPase, que é inibida pelo omeprazol (DE MILITO; FAIS, 2005). Em linhagens de fibrossarcomas humano (HT1080) as células apresentaram menor proliferação quando tratadas com 0,9mM de DCA e 40 μ M OMP por 7 dias, enquanto células normais da linhagem de fibrossarcomas humano (WI-38) não apresentaram diferença em relação ao controle (ISHIGURO et al., 2012). O uso do omeprazol também mostrou eficácia

³ Smith, D. E., Ann. N. Y. Acad. Sci., 103: 40, 1963

quando associado com doxorrubicina em linhagem de tumor mamário de humano (MDA-MB-468). A concentração de 50 μ M de OMP associado com 30nM de doxorrubicina teve mais efeito na morte celular do que a doxorrubicina usada isoladamente (GOH; SLEPTSOVA-FREIDRICH; PETROVIC, 2014).

O tratamento com omeprazol associado ou não com o DCA também não mostrou diminuição muito significativa nas linhagens de mastocitoma. Na linhagem T18, o omeprazol isolado teve apenas uma diminuição na quantidade de células com 0,02mM, e quando associado com o DCA tendeu a aumentar o número de células. Na linhagem T6 após 5 dias de tratamento com omeprazol resultou em diminuição no número de células nas concentrações 0,1 e 0,2mM, porém associado com o DCA teve redução apenas na concentração de 0,2mM associado com 20mM de DCA.

Outra substância que em associação com DCA possui dados satisfatórios na literatura é a metformina. Em linhagens tumorais de carcinoma de ovário humano (SKOV3 e OVCAR3) as concentrações que mais inibiram a viabilidade celular foram de 40mM de DCA e 10mM de MET (LI et al., 2016). Linhagens de tumor mamário humano (MCF7 e T47D) também foram tratadas com 8mM de MET em associação com DCA nas concentrações de 0,5-5mM e tiveram menor viabilidade celular, representando uma promessa de nova terapia para o câncer de mama (HAUGRUD et al., 2014).

A metformina na linhagem T18 apresentou redução no número de células após 72 horas de tratamento com as três concentrações 0,02mM, 0,2mM e 2mM, porém no quinto dia pós tratamento não apresentou diferença em relação ao controle de células não tratadas. Associada ao DCA 10mM e 20mM as células tiveram um expressivo aumento de viabilidade tanto em 72 horas como em 5 dias após o tratamento. Nas células T6 a tendência também foi ocorrer aumento no número de células.

Já na linhagem de melanoma murino, as células B16-F10 apresentaram redução no número de células tanto nas associações com omeprazol quanto de metformina, principalmente nas concentrações de 10 e 20mM de DCA. Isso ilustra

que o efeito das associações com o dicloroacetato dependem do tipo de tumor que é tratado. Em relação a metformina, outros estudos utilizaram maior concentrações, de 10 – 40mM, sendo que foi descrito que até 8mM é viável sua utilização *in vivo* (OWEN; DORAN; HALESTRAP, 2000). Porém, em estudo prévio utilizando a metformina isolada vimos que em 5 dias o tratamento com até 2mM de MET causa perda de viabilidade celular nas células B16-F10.

Já foi citado que em estudos crônicos de toxicidade em cães, as doses de 12,5; 39.5 ou 72mgKgdia por 90 dias, acarretaram em efeitos colaterais como dispneia, neuropatia periférica, hepatotoxicidade e mortalidade em três de oito cães que receberam a dose mais alta (CICMANEC et al.⁴, 1991 apud MAISENBACHER et al., 2013). A farmacocinética do DCA foi investigada em três cães saudáveis da raça Beagle. Foram administradas doses diárias de 3,125; 6,25 e 12,5 mg/Kg uma vez por dia durante 48 horas. A dose de 6,25 foi escolhida para ser administrada a cada 12 horas durante 28 dias (MAISENBACHER et al., 2013).

Os dados indicaram que os cães metabolizam o DCA pela glutathione-S-transferase (GSTZ1) assim como os roedores e humanos, porém em cães a diminuição da concentração plasmática é mais lenta que em outras espécies. Nessas concentrações a administração do DCA foi tolerada e os animais não tiveram redução de apetite, diarreia, vomito, fraqueza, alterações na marcha ou alterações significativas em transaminases hepáticas, proteína total ou bilirrubina.

O peso molecular do DCA é de aproximadamente 151g/mol. Em nossos estudos, a concentração de DCA efetiva para diminuir significativamente a viabilidade celular foi de 60 a 100 Mm. Acreditamos que para utilizar o DCA para o tratamento de mastocitomas caninos *in vivo*, a dose oral deste fármaco terá de ser muito elevada para garantir a concentração plasmática de 60 a 100 Mm. Isto tornaria inviável seu uso em cães, já que, segundo MAISENBACHER et al., 2013, a dose de DCA segura para cães é de até 12,5 mg/kg.

⁴ Cicmanec JL, Condie LW, Olson GR, Wang SR. 90-Day toxicity study of dichloroacetate in dogs. *Fundam Appl Toxicol*

Estudo clínico pode ser definido como: qualquer investigação em seres humanos, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos de produto(s) e/ou identificar reações adversas ao produto(s) em investigação, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia.” (EMEA, 1997)⁵. Porém, antes da fase de estudo clínico é importante realizar uma fase não-clínica, em que as substâncias são testadas em laboratórios e em animais de experimentação. O objetivo principal desta fase é verificar como esta substância se comporta num organismo e não raras vezes os projetos são cancelados por não se mostrarem satisfatórios (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA, 2017).

Os critérios que norteiam o desenvolvimento de novos fármacos são qualidade, eficácia e segurança. A avaliação destes parâmetros dos compostos candidatos a fármacos é realizada por meio de estudos de toxicidade e atividade *in vitro* e *in vivo*. Os problemas que podem ser detectados dessa fase são: farmacocinética desfavorável, toxicidade do composto, eficácia não comprovada e/ou aparecimento de efeitos adversos. Os testes realizados *in vitro* em substituição a estudos *in vivo* são recomendados desde que o teste seja validado e internacionalmente aceito (ANVISA, 2013).

Este estudo demonstrou a importância da realização de testes prévios ao tratamento de pacientes com novas substâncias ou novas finalidades para substâncias já conhecidas. Como foi demonstrado, o DCA nas menores concentrações utilizadas não resultou em diminuição na viabilidade celular e principalmente nas concentrações de 10 e 20mM ocorreu aumento no número de células tumorais de mastocitoma canino nas linhagens testadas.

O objetivo de qualquer estudo experimental é responder questões relevantes utilizando metodologias adequadas. Consideramos que a realização deste estudo foi importante para obter informações sobre os efeitos do DCA e associações em mastocitomas caninos. Os resultados deverão ser divulgados e evitarão o uso

⁵ Agencia Europea de Medicamentos – 1997

indiscriminado deste fármaco, cujas consequências poderiam ser adversas para os cães portadores de mastocitomas.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos podemos concluir que:

- O tratamento apenas com dicloroacetato de sódio nas concentrações até 20mM não foi eficaz em diminuir a população de células de mastocitomas canino de graus 2 e 3 *in vitro*.
- O tratamento apenas com dicloroacetato de sódio nas concentrações de 60mM, 70mM, 80mM, 90mM e 100mM diminuiu significativamente a população de células de mastocitoma canino nas linhagens T6 e T17. Já na linhagem de mastocitoma canino T18 essa queda no número de células ocorreu nas concentrações 80mM, 90mM e 100mM.
- A associação de dicloroacetato nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mM e metformina 0,02; 0,2 e 2,0 mM não é eficaz no tratamento das linhagens T18 e T6 de mastocitoma canino *in vitro*
- A associação de dicloroacetato nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mM e omeprazol 0,02; 0,1 e 0,2 mM não é eficaz no tratamento das linhagens T18 e T6 de mastocitoma canino *in vitro*

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKINS, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 109-112p.

ANVISA (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) **Guia para a condução de estudos não clínicos detoxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: ANVISA, .2013. Disponível em: <http://leg.ufpi.br/subsiteFiles/ppgcf/arquivos/files/Guia_ensaios_ao_clinicos.pdf> .Acesso em: 12 jan. 2017.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Metformin: Its botanical background. **Practical Diabetes International**, v. 21, n. 3, p. 115-117, 2004.

BEN SAHRA, I.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.-F.; BOST, F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 5, p. 1092-9, 2010.

BENSAAD, K.; VOUSDEN, K. H. p53: new roles in metabolism. **ScienceDirect**, v. 17, n. 6, p. 286-291, 2007.

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

BLOOM, G. D. Electron microscopy of neoplastic mast cells: a study of the mouse mastocytoma mast cell. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 4716, 1963.

BONNET, S.; ARCHER, S. L.; ALLALUNIS-TURNER, J.; HAROMY, A.; BEAULIEU, C.; THOMPSON, R.; LEE, C. T.; LOPASCHUK, G. D.; PUTTAGUNTA, L.; BONNET, S.; HARRY, G.; HASHIMOTO, K.; PORTER, C. J.; ANDRADE, M. A.; THEBAUD, B.; MICHELAKIS, E. D. A Mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2007.

BOSTOCK, D. E. Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 1, p. 1–19, 1986.

CALABRESE, E. J. Hormesis and medicine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 66, n. 5, 2008.

CAO, W.; YACOUN, S.; SHIVERICK, K. T.; NAMIKI, K.; SAKAI, Y.; PORVASNIK, S.; URBANEK, C.; ROSSER, C. J. Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation. **Prostate**, v. 68, n. 11, p. 1223–1231, 2008.

CHEN, Z.; LU, W.; GARCIA-PRIETO, C.; HUANG, P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 3, p. 267–274, 2007.

COOPER, M.; TSAI, X. R.; BENNETT, P. Combination CCNU and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumours: 57 cases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 196–206, 2009.

COSTA-CASAGRANDE, T.A.; ELIAS, D.S.; MELO, S.R.; MATERA, J. M. Estudo retrospectivo do mastocitoma canino no serviço de cirurgia de pequenos animais – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 176–183, 2008.

DAHLIN, J. S.; HALLGREN, J. Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. **Molecular Immunology**, v. 63, n. 1, p. 9–17, 2015.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.018>>. Acesso em: 03 out. 2016.

DE MILITO, A.; FAIS, S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. **Future Oncology**, v. 1, n. 6, p. 779–786, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/14796694.1.6.779>>. Acesso em: 3 fev. 2017.

DE MILITO, A.; IESSI, E.; LOGOZZI, M.; LOZUPONE, F.; SPADA, M.; MARINO, M. L.; FEDERICI, C.; PERDICCHIO, M.; MATARRESE, P.; LUGINI, L.; NILSSON, A.; FAIS, S. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors

through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. **Cancer Research**, v. 67, n. 11, p. 5408–5417, 2007.

DELANEY, L. M.; HO, N.; MORRISON, J.; FARIAS, N. R.; MOSSER, D. D.; COOMBER, B. L. Dichloroacetate affects proliferation but not survival of human colorectal cancer cells. **Apoptosis**, v. 20, n. 1, p. 63–74, 2015.

DEVINNEY, R.; GOLD, W. M. Establishment of Two Dog Mastocytoma Cell Lines in Continuous Culture. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 3, p. 413-420, 1990.

DUNBAR, E. M.; COATS, B. S.; SHROADS, A. L.; LANGAEE, T.; LEW, A.; FORDER, J. R.; SHUSTER, J. J.; WAGNER, D. A.; STACPOOLE, P. W. Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors. **Investigational New Drugs**, v. 32, n. 3, p. 452-464, 2014.

DUNN, T. B.; POTTER, M. A transplantable mast-cell neoplasm. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 18, n. 4, p. 587-601, 1957.

EICHELBERG, H.; SEINE, R. Life expectancy and cause of death in dogs. I. The situation in mixed breeds and various dog breeds. **Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift**, v. 109, n. 8, p. 292–303, ago. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9005839>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

EVANS, J. M. M.; DONNELLY, L. A.; EMSLIE-SMITH, A. M.; ALESSI, D. R.; MORRIS, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v. 330, n. 7503, p. 1304–1305, 4 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15849206>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

FAIS, S.; DE MILITO, A.; YOU, H.; QIN, W. Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 22, p. 10627–10630, 2007.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. 343–346, 2016.

FONSECA, I. I. M. **Avaliação da expressão do gene supressor de tumor PTEN**,

proto-oncogene c-kit, matrilisina (MMP-7), Conexinas 32 e 43 e do complexo E-caderinas/cateninas em mastocitomas da espécie canina: estudos ex vivo e in vitro. Tese - (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GALLAMINI, A.; ZWARTHOED, C.; BORRA, A. Positron emission tomography (PET) in oncology. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 1821–1889, 2014.

GALLI, S. J.; HAMMEL, I. Mast cell and basophil development. **Current Opinion in Hematology**, v. 1, n. 1, p. 33–9, jan. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371257>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891–899, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc1478>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Glycolysis in cancer: A potential target for therapy. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 1358–1366, 2007.

GIEGER, T. L.; THÉON, A. P.; WERNER, J. A.; MCENTEE, M. C.; RASSNICK, K. M.; DECOCK, H. E. Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 cases (1990–2001). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 687–692, 2003.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109–113, 1986.

GOH, W.; SLEPTSOVA-FREIDRICH, I.; PETROVIC, N. Use of proton pump inhibitors as adjunct treatment for triple-negative breast cancers. An Introductory Study. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 439–446, 2014.

GOVIER, S. M. Principles of treatment for mast cell tumors. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 103–106, 2003.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. Mast cell tumors. *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathological Diagnosis*. Oxford, Blackwell Science Ltd: 2005. p. 853-865.

H. FUJIMOTO, M. ISOMURA, K. A. Establishment and characterization of a new canine b-cell leukemia cell line. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 5, p. 469–471, 1996.

HARTING, T.; STUBBENDORFF, M.; WILLENBROCK, S.; WAGNER, S.; SCHADZEK, P.; NGEZAHAYO, A.; ESCOBAR, H.; NOLTE, I. The effect of dichloroacetate in canine prostate adenocarcinomas and transitional cell carcinomas in vitro. **International Journal of Oncology**, v. 49, p. 2341–2350, 2016. Disponível em: <<http://www.spandidospublications.com/10.3892/ijo.2016.3720>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

HAUGRUD, A. B.; ZHUANG, Y.; COPPOCK, J. D.; MISKIMINS, W. K. Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 147, n. 3, p. 539–50, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25212175>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

ISHIGURO, T.; ISHIGURO, M.; ISHIGURO, R.; IWAI, S. Cotreatment with dichloroacetate and omeprazole exhibits a synergistic antiproliferative effect on malignant tumors. **Oncology Letters**, v. 3, n. 3, p. 726–728, 2012.

ISHIGURO, T.; KADOSAWA, T.; TAKAGI, S.; KIM, G.; OHSAKI, T.; BOSNAKOVSKI, D.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T. Relationship of disease progression and plasma histamine concentrations in 11 dogs with mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 2, p. 194–198, 2003. Disponível em: <papers2://publication/uuid/1C8DB9F8-1576-4E9B-98FF-918A68DDAEC8>. Acesso em: 15 jan. 2017.

JUNQUEIRA, L. . C.; CARNEIRA, J. *Biologia celular e molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p. 69-71.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. p. 95-98.

KALINER, M.; AUSTEN, K. F. Cyclic AMP, ATP, and reversed anaphylactic histamine release from rat mast cells. **Journal of immunology**, v. 112, n. 2, p. 664–74, 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4130694>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

KIMURA, K. C.; GÁRATE, A. P.; DAGLI, M. L. Z. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: a survey between 1993 and 2002 of the Service of Animal Pathology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 5, n. 2, p. 60–69, 2012.

KIRSHENBAUM, A. S.; KESSLER, S. W.; GOFF, J. P.; METCALFE, D. D. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34 + bone marrow progenitor cells. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 1410–1415, 1991.

KITAMURA, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. **Annual Review of Immunology**, n. 8, p. 59–76, 1989.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. a; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; W SNYDER, P.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. a; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 147–55, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062911>>. Acesso em: 5 fev. 2017

KO, L.; ALLALUNIS-TURNERJ., A. **Investigation on the mechanism of dichloroacetate (DCA) induced apoptosis in breast cancer**. Alexandria: ASCO University, 2009. Disponível em: <<http://meetinglibrary.asco.org/print/582690>>. Acesso em: 3 fev. 2017.

LANTZ, C. S.; BOESIGER, J.; SONG, C. H.; MACH, N.; KOBAYASHI, T.; MULLIGAN, R. C.; NAWA, Y.; DRANOFF, G.; GALLI, S. J. Role for interleukin-3 in mast cell and basophil development and immunity to parasites. **Nature**, v. 392, n. March, p. 90–93, 1998.

LEE, Y.-Y.; JEON, H.-K.; HONG, J. E.; CHO, Y. J.; RYU, J. Y.; CHOI, J.-J.; LEE, S. H.; YOON, G.; KIM, W. Y.; DO, I.-G.; KIM, M. K.; KIM, T.-J.; CHOI, C. H.; LEE, J.-W.; BAE, D.-S.; KIM, B.-G. Proton pump inhibitors enhance the effects of cytotoxic agents in chemoresistant epithelial ovarian carcinoma. **Oncotarget**, v. 6,

n. 33, p. 35040–35050, 2015. Disponível em:

<<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L606844230%5Cnhttp://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.5319>>. Acesso em: 3 fev. 2017.

LETARD, S.; YANG, Y.; HANSSENS, K.; PALMÉRINI, F.; LEVENTHAL, P. S.; GUÉRY, S.; MOUSSY, A.; KINET, J.-P.; HERMINE, O.; DUBREUIL, P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. **Molecular Cancer Research** : MCR, v. 6, n. 7, p. 1137-1145, 2008.

LI, B.; LI, X.; NI, Z.; ZHANG, Y.; ZENG, Y.; YAN, X.; HUANG, Y.; HE, J.; LYU, X.; WU, Y.; WANG, Y.; ZHENG, Y.; HE, F. Dichloroacetate and metformin synergistically suppress the growth of ovarian cancer cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, 2016. Disponível em: <www.impactjournals.com/oncotarget>. Acesso em: 1 fev. 2017.

LIBBY, G.; DONNELLY, L. A.; DONNAN, P. T.; ALESSI, D. R.; MORRIS, A. D.; EVANS, J. M. M. New users of metformin are at low risk of incident cancer a cohort study among people with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, p. 1620–1625, 2009.

LONDON, C. A.; GALLI, S. J.; YUUKI, T.; HU, Z. Q.; HELFAND, S. C.; GEISLER, E. N. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-kit. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 4, p. 689–697, 1999.

LUCIANI, F.; SPADA, M.; DE MILITO, A.; MOLINARI, A.; RIVOLTINI, L.; MONTINARO, A.; MARRA, M.; LUGINI, L.; LOGOZZI, M.; LOZUPONE, F.; FEDERICI, C.; IESSI, E.; PARMIANI, G.; ARANCIA, G.; BELARDELLI, F.; FAIS, S. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 22, p. 1702–1713, 2004.

MACY, D. W. Canine Mast Cell Tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 15, n. 4, p. 783–803, 1985.

MADHOK, B. M.; YELURI, S.; PERRY, S. L.; HUGHES, T. a; JAYNE, D. G. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 12, p. 1746–52, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2883702&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

MAHONEY, B. P.; RAGHUNAND, N.; BAGGETT, B.; GILLIES, R. J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 1207–1218, 2003.

MAISENBACHER, H. W.; SHROADS, A. L.; ZHONG, G.; DAIGLE, A. D.; ABDELMALAK, M. M.; SAMPER, I. S.; MINCEY, B. D.; JAMES, M. O.; STACPOOLE, P. W. Pharmacokinetics of oral dichloroacetate in dogs. **Journal of Biochemical Molecular Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 522–525, 2013.

MARIE, S. K. N.; SHINJO, S. M. O. Metabolism and brain cancer. **Clinics**, v. 66 Suppl 1, p. 33–43, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 115-154.

MATTSON, M. P. Hormesis. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2009.

MCNIEL, E. A.; PRINK, A. L.; O'BRIEN, T. D. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. **Veterinary and cComparative Oncology**, v. 4, n. 1, p. 2–8, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754824>>. Acesso em: 5 jan. 2017.

METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033–1079, 1997.

MICHELAKIS, E. D.; MICHELAKIS, E. D.; SUTENDRA, G.; DROMPARIS, P.; WEBSTER, L.; HAROMY, A.; NIVEN, E.; MAGUIRE, C. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. **Science Translational Medicine**, v. 34, p. 1–8, 2010.

MICHELAKIS, E. D.; WEBSTER, L.; MACKEY, J. R. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 7, p. 989–94, 7 out. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2567082&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

MICHELL, A. R. Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v. 145, n. 22, p. 625–9, 27 nov. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619607>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

MICKUVIENE, I.; KIRVELIENE, V.; JUODKA, B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 5, p. 639–648, 2004.

MISDORP, W. Mast cells and canine mast cell tumours: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 26, n. 4, p. 156–69, 2004. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.2004.9695178?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed#.VSfxq_nF-24>. Acesso em: 11 nov. 2015.

MORI, A.(Ed.). **Guanidines : historical, biological, biochemical, and clinical aspects of the naturally occurring guanidino compounds**. New York: Springer, 1985.

MULLINS, M. N.; DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J.; EHRHART, E. J.; THAMM, D. H.; LANA, S. E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n. 1, p. 91–95, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16426175>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

OH, S. Y.; BRANDAL, S.; KAPUR, R.; ZHU, Z.; TAKEMOTO, C. M. Global microRNA expression is essential for murine mast cell development in vivo. **Experimental Hematology**, v. 42, n. 10, p. 919–923.e1, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X14006201>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

OWEN, M. R.; DORAN, E.; HALESTRAP, A. P. Complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **Biochemical Society** v. 614, p. 607–614, 2000.

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 5, p. 469–474, 1984.

PELT, D. R.; FOWLER, J. D.; LEIGHTON, F. a. Multiple cutaneous mast cell tumors in a dog: a case report and brief review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 7, p. 259–263, 1986.

POSTOVIT, L. M.; ADAMS, M. A.; LASH, G. E.; HEATON, J. P.; GRAHAM, C. H. Oxygen-mediated regulation of tumor cell invasiveness: Involvement of a nitric oxide signaling pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35730–35737, 2002.

PROSCHOWSKY, H. F.; RUGBJERG, H.; ERSBOLL, A. K. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 1-2, p. 63–74, 2003.

ROBBIE-RYAN, M.; BROWN, M. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, n. 6, p. 728–733, 2002.

RUGGIERI, V.; AGRIESTI, F.; SCRIMA, R.; LAURENZANA, I.; PERRONE, D.; TATARANNI, T.; MAZZOCCOLI, C.; LO MUZIO, L.; CAPITANIO, N.; PICCOLI, C. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 1217–1230, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25544754>><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359228/pdf/oncotarget-06-1217.pdf>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

SCASE, T. J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 151–8, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496935>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N. F.; BREGAZZI, V. S.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E.; DERNELL, W. S.; FETTMAN, M. J.; WITHROW, S. J. Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 7, p. 1120–3, 1 abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318363>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

SLAMON, D. J.; LEYAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; FLEMING, T.; EIEMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM, M.; BASELGA, J.; NORTON, L. Numb Er 11 use of chemotherapy plus a monoclonal

antibody against Her2. **English Journal**, v. 344, n. 11, p. 783–792, 2001.
Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200103153441101>>.
Acesso em: 25 dez. 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROFISSIONAIS EM PESQUISA CLÍNICA. **Quais as fases de um estudo clínico?**. Disponível em:
<http://www.sbppc.org.br/portal/index.php?option=com_content&task=view&id=14&Itemid=37>. Acesso em: 5 fev. 2017.

SOUZA, T. M. de; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. de.
Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555–560, abr. 2006. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000200030&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 14 dez. 2016.

STACPOOLE, P. W. Review of the pharmacologic and therapeutic effects of diisopropylammonium dichloroacetate (DIPA). **Journal of Clinical Pharmacology and the Journal of New Drugs**, v. 9, n. 5, p. 282–91, 1969. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4902026>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

STACPOOLE, P. W. The pharmacology of dichloroacetate. **Metabolism**, v. 38, n. 11, p. 1124–1144, 1989.

STANNARD, A. A.; PULLEY, T. Skin and soft tissues. In: MOULTON, J. E. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 2nd ed. Berkeley: University of California Press, 1978. p. 26–31.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 1-16, 2011.

STRAUSS, L. G.; CONTI, P. S. The Applications of PET in Clinical Oncology. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 32, n. 4, p. 623–648, 1991.

STREFEZZI, D. R.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATÃO-DIAS, J. L. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.7, p. 559-656, 2010.

SUN, R. C.; FADIA, M.; DAHLSTROM, J. E.; PARISH, C. R.; BOARD, P. G.; BLACKBURN, A. C. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate

inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 1, p. 253–260, 2010.

SUTENDRA, G.; MICHELAKIS, E. D. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. March, p. 38, 2013. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84883271078&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

TEDARDI, M. V. **Estudo da viabilidade da implantação de um registro de câncer animal na cidade de São Paulo, SP, Brasil**. Dissertação - (Mestre em ciências) - 2014. Universidade de São Paulo, 2014. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

THAMM, D. H.; TUREK, M. M.; VAIL, D. M. Outcome and prognostic factors following adjuvant prednisone/vinblastine chemotherapy for high-risk canine mast cell tumour: 61 cases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 6, p. 581–587, 2006. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/68.581?from=CrossRef>>.

TIZARD, I. R. Como se inicia a inflamação. In: **Imunologia Veterinária**. 8. ed. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 19–20.

TSUJIMURA, T.; FURITSU, T.; MORIMOTO, M.; ISOZAKI, K.; NOMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; KITAMURA, Y.; KANAKURA, Y. Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. **Blood**, v. 83, n. 9, p. 2619–26, 1994. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/83/9/2619.abstract>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5930, p. 1029–33, 22 maio 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849637&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 jul. 2014.

VELLA, S.; CONTI, M.; TASSO, R.; CANCEDDA, R.; PAGANO, A. Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 7, p. 1484–1493, 2012.

WANG, B.-Y.; ZHANG, J.; WANG, J.-L.; SUN, S.; WANG, Z.-H.; WANG, L.-P.; ZHANG, Q.-L.; LV, F.-F.; CAO, E.-Y.; SHAO, Z.-M.; FAIS, S.; HU, X.-C. Intermittent high dose proton pump inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy in metastatic breast cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research** : CR, v. 34, p. 85, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4546346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

WARBURG, O. The metabolism of carcinoma cells. **Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 148–163, 1925. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/jcr.1925.148>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 123, n. 3191, p. 309–14, 24 fev. 1956. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; HOWARD, J.; RÜFENACHT, S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 6, p. 321–39, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980632>>. Acesso em: 22 jul. 2016.

WERNERSSON, S.; PEJLER, G. Mast cell secretory granules: armed for battle. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 7, p. 478–94, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903914>>. Acesso em: 15 nov. 2017.

WONG, J. Y. Y.; HUGGINS, G. S.; DEBIDDA, M.; MUNSHI, N. C.; VIVO, I. De. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. **Gynecologic Oncology**, v. 109, n. 3, p. 394–402, 2009.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Small Animal clinical Oncology**. 5th ed. St. Louis: Elsevier, 2013. p. 335-351.

YELURI, S.; MADHOK, A. B.; PRASAD, A. K. R.; QUIRKE, A. P.; JAYNE, A. D. G. Cancer's craving for sugar: an opportunity for clinical exploitation. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, p. 867–877, 2009.