

CARINE FERNANDES BOTELHO

**ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E DE
CULTURA DE CÉLULAS DE TECIDOS NORMAIS E
CANCEROSOS DA MAMA HUMANA E CANINA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

CARINE FERNANDES BOTELHO

**ESTUDO HISTOLÓGICO, IMUNO-HISTOQUÍMICO E DE
CULTURA DE CÉLULAS DE TECIDOS NORMAIS E
CANCEROSOS DA MAMA HUMANA E CANINA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.**

APROVADA: 16 de fevereiro de 2009

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta
(Coorientador)

Prof. Ricardo Junqueira Del Carlo
(Coorientador)

Profª. Marisa C.G. Leite Santos

Profª. Marlene I. V. Vilorio

Prof. Marcelo José Vilela
(Orientador)

**Ao meu marido Marcelo e aos meus pais,
Isaura e Manoel, por caminharem
sempre ao meu lado me transmitindo
força e segurança.**

Não importa de onde você **vem**, importa quem você **é**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por me dar saúde e força, para alcançar mais esta conquista.

Ao professor Marcelo Vilela, que sempre esteve do meu lado e que acreditou em mim, quando muitos tiveram dúvidas. Com seu jeito firme, sempre mostrou esse coração enorme que bate em seu peito e que sempre valorizou o ser humano pelo que é e, não, pelo que tem. Levarei comigo toda a sua simplicidade como pessoa e a sua honestidade e competência como profissional. Saiba também que, por onde eu passar, tentarei deixar o que o senhor mais se preocupou em nos ensinar: o respeito e o compromisso para com os outros. Não há palavras suficientes para expressar o meu agradecimento e a minha satisfação de tê-lo como meu orientador. Este Mérito é nosso!

Ao professor Sérgio da Matta que, além de meu coorientador, contribuiu para minha formação, o meu respeito e a minha eterna gratidão.

Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo, sempre presente, ajudando-me a resolver os problemas. Sua participação foi muito importante!

A Tatinha que, com sua paciência e sabedoria, contribuiu diretamente para a realização deste trabalho.

Ao Cláudio e ao Adão, sempre prontos para me ajudar.

Ao Dr. Jackson Roberto de Moura e ao Dr. Renato Del Giúdice, que contribuíram para o enriquecimento desse trabalho.

À Vânia, sempre disposta a ajudar e, com seu carisma e sua sabedoria, me estendeu as mãos nos momentos em que mais precisei. Sua participação foi muito importante!

À professora Marlene Isabel Vargas Vilorio, que teve um papel muito importante na realização deste trabalho.

À professora Marisa, por transmitir suas experiências, seus conhecimentos e pelo seu companherismo. Não há palavras para lhe agradecer.

À Renata e à Andressa, que me transmitiram seus conhecimentos e que foram muito importantes durante a minha caminhada.

À Rose que, com sua simplicidade e seu carinho, me transmitiu sua grande experiência e sabedoria, tornando mais fáceis as dificuldades, pois sempre estava presente

para nos ajudar, sendo companheira de toda as horas.Você é muito especial e levarei comigo todo respeito e admiração. Obrigada por tudo!

À Lorena, meu braço direito e minha companheira. Por meio da convivência, nos tornamos grandes amigas. Esta amizade será eterna...

Ao Juliano e à Vanessa, pois tornaram os dias melhores, durante esta jornada. Obrigada por compartilharem dessa minha trajetória!

Ao Marquinho, que me ensinou as técnicas básicas e de grande importância para a rotina do laboratório.Você compartilhou dessa jornada!

À Maria do Carmo, pelo apoio e por me ajudar nas correções do português.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES	1
1.2. A GLÂNDULA MAMÁRIA	2
1.2.1. Anatomia, embriologia e morfologia da mama humana.....	2
1.2.2. Anatomia, embriologia e morfologia da mama canina.....	4
1.3. O CÂNCER DE MAMA.....	7
1.3.1. O câncer de mama em mulheres	7
1.3.2. O câncer de mama em cadelas.....	12
1.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	14
1.4.1. Anticorpos monoclonais.....	14
1.4.2. O ensaio imuno-histoquímico	16
1.4.3. Caracterização do câncer de mama por imuno-histoquímica	17
1.4.4. O Anticorpo monoclonal anti-desmogleína-1 (32-2B) como marcador epitelial.....	18
1.5. CULTURA DE CÉLULAS	22
II. OBJETIVOS	25
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
III. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. ÉTICA.....	26
3.3. TRANSPORTE E COLETA DO MATERIAL	27
3.5. TÉCNICA DA GOTA INVERTIDA	27
3.6. CULTURA DE CÉLULAS PROVENIENTES DOS TECIDOS NORMAIS E CANCEROSOS DA MAMA HUMANA E CANINA.....	28
3.6.1. <i>Tripsinização branda</i>	29
3.7. PREPARO DO MATERIAL PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	29
3.8. PREPARO DO MATERIAL PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	29
3.9.1. <i>Imagens referentes às células em cultura</i>	30
3.9.2. <i>Imagens referentes às análises histológica, histopatológica e imuno-histoquímica</i>	30
IV. RESULTADOS.....	31
4.1. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DOS FRAGMENTOS NORMAIS E CANCEROSOS DA MAMA DAS ESPÉCIES CANINA (CADELAS) E HUMANA (MULHERES)	31
4.1.2. <i>Avaliação histológica e histopatológica em cadelas</i>	31
4.1.3. <i>Avaliação histológica e histopatológica em mulheres</i>	33
4.1.4. <i>Colorações especiais</i>	34
4.2. CULTURA DE CÉLULAS.....	35
4.2.1. <i>Cultura de células provenientes da mama normal de cadelas</i>	35
4.2.2. <i>Cultura de células provenientes de tumores malignos da mama de cadelas</i>	37
4.2.3. <i>Cultura de células provenientes da mama normal de mulheres</i>	39
4.2.4. <i>Cultura de células provenientes de tumores malignos da mama de mulheres</i>	40
4.3. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOLÓGICA	42
V. DISCUSSÃO	44
5.1. CULTURA DE CÉLULAS.....	44
5.2. IMUNO-HISTOQUÍMICA	45
VI. CONCLUSÕES	48
VII. PERSPECTIVAS.....	49
XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

IX. ANEXOS	59
9.1. PROTOCOLOS	59
<i>Inclusão em parafina</i>	59
<i>Coloração Hematoxilina e Eosina</i>	60
<i>Coloração com Tricrômico de Gomori.....</i>	61
<i>Coloração com Azul de Toluidina.....</i>	62
<i>Preparo do material para imuno-histoquímica</i>	62
SOLUÇÕES E REAGENTES	64
<i>Meio de cultura</i>	64
<i>Meio de cultura completo (MC).....</i>	65
<i>Soro fetal bovino (FCS)</i>	65
<i>Meio completo suplementado (MCS).....</i>	65
<i>Solução de antibióticos</i>	65
<i>Fator de Crescimento Epidermal.....</i>	66
<i>Hidrocortisona (SIGMA H6909).....</i>	66
<i>Cólera toxina</i>	66
<i>Insulina</i>	66
<i>PBS (Tampão fosfato) estéril</i>	66
<i>Solução de tripsina estéril.....</i>	67
<i>Formaldeído tamponado.....</i>	67
<i>Anticorpos.....</i>	67
<i>Tampão TBS.....</i>	67
<i>Solução de Ácido Fucsina-Orange G</i>	68
<i>Solução Azul de Toluidina</i>	68
<i>Solução de Tricrômico de Gomori.....</i>	68
<i>Solução Água Acidificada.....</i>	68

RESUMO

BOTELHO, Carine Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. Fevereiro, 2009.
Estudo Histológico, Imuno-Histoquímico e de Cultura de Células de Tecidos Normais e Cancerosos da Mama Humana e Canina. Orientador: Marcelo José Vilela.
Coorientadores: Ricardo Junqueira Del Carlo e Sérgio Luís Pinto da Matta.

O câncer está incluído entre as entidades patológicas que mais acometem a mama feminina. A cada ano, cresce o número de mulheres acometidas pelo câncer de mama e também as pesquisas sobre a biologia desse tumor, aí incluídas aquelas que utilizam modelos animais, principalmente os tumores de mama de cadelas. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um estudo comparativo entre as células normais e cancerosas da glândula mamária de mulheres e de cadelas *in vitro*, além de analisar pela primeira vez a expressão da desmogleína-1, uma glicoproteína desmossômica, em células cancerosas da mama da espécie canina. Para a cultura de células foi utilizada a técnica da gota invertida enquanto que para a imuno-histoquímica foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, utilizando o anticorpo monoclonal 32-2B (anti-desmogleína-1). As células da glândula mamária normal humana (mulheres) demonstraram semelhanças com as células da glândula mamária normal canina (cadela) quanto aos aspectos histológicos e morfológicos. Foi possível observar a adesão e a proliferação de células normais e cancerosas de ambas as espécies por aproximadamente três meses de cultura. As células normais das espécies humana e canina demonstraram baixa atividade de proliferação, quando comparadas com as cancerosas de ambas as espécies. Os grupos de células epitelióides que aderiram ao substrato da garrafa de ambas as culturas, possuíam dependência das células estromais, pois, à medida que as células fibroblastóides eram retiradas, as células epitelióides cessavam seu crescimento. Comparando os resultados obtidos por meio da análise imuno-histoquímica das células normais das espécies humana e canina, foi possível observar mudanças no padrão de coloração em células cancerosas de ambas as espécies, demonstrando que as estruturas relacionadas com a adesão celular (neste caso, os desmossomas) podem estar alteradas. Acredita-se que este trabalho servirá de base para outros que tenham como objetivo estudar o câncer de mama.

ABSTRACT

BOTELHO, Carine Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa. February, 2009.
Histological study, immunohistochemistry and cell culture of normal tissues and cancer of the breast and Human Dog. Adviser: Marcelo José Vilela. Co-advisers: Ricardo Junqueira Del Carlo and Sérgio Luís Pinto da Matta.

Cancer is included among the pathological entities which most assail female breast. Each year, the number of women affected by breast cancer increases, and also the number of researches on the biology of this tumor, there included those utilizing animal models, specially canine mammary tumors. This work aimed to develop a comparative study between normal and cancer cells from mammary gland of women and bitches *in vitro*, besides analyzing for the first time the expression of desmoglein-1, a desmosomal glycoprotein, in cancer cells from canine specie breast. For the cell culture, hanging drop technique was utilized, while the streptavidine-biotine-peroxidase was used for immunohistochemistry, with monoclonal antibody 32-2B (anti-desmoglein-1). The cells from human normal mammary gland (women) demonstrated similarities towards canine normal mammary gland, in relation to histological and morfological aspects. It has been possible to observe adhesion and proliferation of normal and cancer cells from both species approximately three months. Normal cells from human and canine species demonstrated low proliferative activity, when compared to cancerous cells from both species. The groups of epithelioids cells, which adhered the bottle substrate from both cultures, depended on stromal cells, since as fibroblastoid cells were removed, epithelioid cells ceased growing. Comparing the obtained results by means of immunohistochemical analysis of normal cells from human and canine species, changes in staining pattern in cancerous cells from both species were observed, demonstrating that structures related to cell adhesion (in this case, desmosomes) might be altered. This study might work as a support for new studies related to breast cancer.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Preliminares

O câncer está incluído entre as entidades patológicas que mais acometem a mama feminina. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer de mama é a segunda causa mais comum de óbitos em mulheres no mundo inteiro.

A cada ano, cresce o número de mulheres acometidas pelo câncer de mama e também as pesquisas sobre a biologia desse tumor, incluídas aquelas que utilizam modelos animais, principalmente os tumores de mama de cadelas. O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais, potencialmente carcinogênicos. As semelhanças entre os tumores de mama humana e de mama de cadela, tais como, a morfologia, a presença de receptores de estrógenos, os órgãos-alvo de metástases, a evolução clínica e a hereditariedade, em alguns casos, motiva o interesse no estudo da patologia comparada, a partir do uso desses modelos animais. Estudos comparativos são importantes para o conhecimento da biologia do crescimento e da organização morfofuncional normal dos tecidos de órgãos humanos e de animais, bem como de tumores, que poderão produzir conhecimento importante para diagnóstico, tratamento, prognóstico e prevenção das neoplasias malignas.

A utilização da técnica do cultivo de células *in vitro* também tem permitido o estudo da biologia tumoral de maneira controlada, bem como a pesquisa de substâncias inibidoras do crescimento neoplásico.

O objetivo principal deste trabalho é estudar células provenientes de tecidos normais e neoplásicas, obtidas de glândulas mamárias de mulheres e de cadelas, por meio da utilização da patologia comparada e da técnica de cultivo celular *in vitro*, estabelecendo-se linhagens celulares e analisando a expressão de desmogleína-1, uma proteína desmossômica, que possui uma importante função na adesão celular e nos fenômenos de invasão e metástases.

1.2. A Glândula Mamária

1.2.1. Anatomia, embriologia e morfologia da mama humana

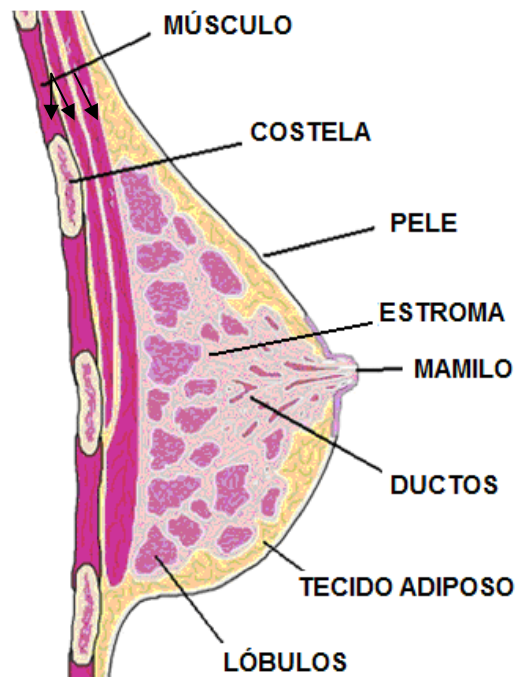


Figura 1 – Representação esquemática da mama humana (MEISNER *et al.*, 2008).

A mama é considerada uma glândula sudorípara modificada, secretora, derivada da pele. Desenvolve-se aproximadamente na sexta semana de vida intra-uterina, surgindo no embrião de ambos os sexos, de cada lado da região axilar até a região inguinal, como um espessamento ectodérmico conhecido como linha mamária (TAFURI, 1989). Essa faixa dá origem, em certos locais, a brotamentos que penetram na derme. Na espécie humana, a maioria dos brotos regride, persistindo somente um em cada lado, localizados sobre o músculo peitoral, na parede torácica superior. Nessa região, ao redor do sexto mês intra-uterino, observa-se um espessamento constituído por 15 a 25 cordões epiteliais sólidos que penetram na derme, a partir da camada basal do mamilo primitivo. Estes cordões sólidos constituirão os canais galactóforos, cujas extremidades se ramificam e constituem os canais excretores e os alvéolos rudimentares da glândula (BRASILEIRO FILHO, 2006).

De acordo com Junqueira e Carneiro (2004 a), cada mama é dividida em 15 a 25 lobos, permeados por tecido conjuntivo denso e adiposo. Embora o conjunto de lobos seja chamado freqüentemente de glândula mamária, cada um deles é de fato uma glândula mamária, pois drenam através de um seio lactífero distinto (KUMAR *et al.*, 2005) e de um ducto excretor próprio ou galactóforo, também chamado ducto terminal, além de possuírem uma parte secretora individual. O ducto excretor se abre, independentemente, na papila mamária ou mamilo e ramifica-se sucessivamente, até a unidade ducto-lobular terminal. O tecido conjuntivo penetra em cada lobo, dividindo-o em lóbulos formados por grupamentos de pequenos alvéolos, que são as unidades funcionais do parênquima mamário (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004 a) (Figura 1).

O estroma interlobular é constituído por tecido conjuntivo fibroso denso e tecido adiposo. Já o estroma intralobular é mais delicado, mixomatoso, hormonalmente responsivo e com presença de células linfocísticas (KUMAR *et al.*, 2005).

Os alvéolos são envolvidos de células contráteis, de natureza mioepitelial, relacionadas com o reflexo de ejeção do leite. As células mioepiteliais também se localizam ao longo dos ductos e são encontradas numa ampla variedade de mamíferos (KUMAR *et al.*, 2005).

A mama é um órgão singular, incompleto ao nascimento, que se submete a alterações cíclicas durante a vida reprodutiva. No início da menarca, os ductos terminais dão origem aos lóbulos e o estroma interlobular aumenta de volume. A cada ciclo menstrual, após a ovulação e sob a influência de estrógeno e de progesterona, a proliferação celular do parênquima mamário aumenta e o estroma torna-se edematoso. Quando ocorre a menstruação, a queda dos níveis hormonais é seguida por apoptose e regressão do volume mamário. Somente com o início da gestação, a mama completa sua maturação morfológica e sua atividade funcional (KUMAR *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Imediatamente após o parto e sob estímulo hormonal (prolactina, lactogênio placentário, ocitocina) (GARTNER e HIATT, 2007), as glândulas secretam o leite. Passada a fase de lactação, as células secretoras sofrem apoptose e a glândula reverte a uma condição de não-grávida, atrofiando-se e diminuindo considerável e

progressivamente de volume até o climatério (KUMAR *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Embora os hormônios sexuais desempenhem papel relevante, tanto para a progressão dos diferentes estágios de desenvolvimento, quanto para a manutenção da diferenciação e posterior regressão, outros hormônios, tais como hormônio de crescimento, glicocorticóides e insulina, também atuam significativamente nesses processos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004 a; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Até a puberdade, a mama masculina desenvolve-se de modo semelhante à mama feminina, mas, nesse momento, esse processo é interrompido (TAFURI, 1989).

1.2.2. Anatomia, embriologia e morfologia da mama canina

Semelhantemente às glândulas mamárias humanas, as glândulas mamárias caninas são estruturas especializadas da pele, originadas embriologicamente da invaginação de brotos ectodérmicos para o interior do mesoderma subjacente (DELLMANN E BROWN, 1982). São classificadas como glândulas túbulo-alveolares compostas, que consistem de unidades secretoras formadas por lóbulos separados por septos tecido conjuntivo.

Reforçando a semelhança com a origem embriológica das glândulas mamárias humanas, as glândulas mamárias caninas desenvolvem-se como botões epiteliais que crescem a partir de espessamentos lineares, formando as cristas mamárias. Na espécie canina (*Canis familiaris*), essas cristas desenvolvem-se em cinco pares nas regiões torácica, abdominal e inguinal (CASSALI, 2002; DYCE *et al.*, 2004). A denominação de cada par de mamas, no sentido crânio-caudal da superfície ventral é: torácico-cranial (T1), torácico-caudal (T2), abdominal-cranial (A1), abdominal-caudal (A2) e inguinal (I) (CASSALI, 2002) (Figura 2).

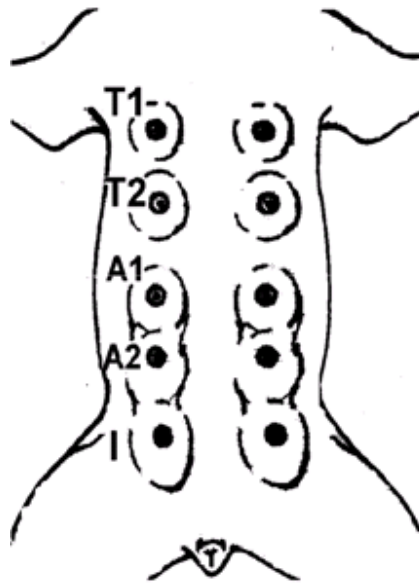


Figura 2 – Representação esquemática dos cinco pares de mama canina e suas denominações. (T1) torácico-cranial, (T2) torácico-caudal, (A1) abdominal-cranial, (A2) abdominal-caudal e (I) inguinal (CASSALI, 2002).

A proliferação do mesênquima que circunda o botão eleva uma teta (papila) sobre a superfície corpórea. Um ou mais brotos epidérmicos surgem no botão mamário, no tecido conjuntivo, e começam a formar canais por ocasião do nascimento. Cada broto constituirá (Figura 3) o sistema de ductos (DYCE *et al.*, 2004).

Esses ductos se abrem em ductos interlobulares, formando dúctulos nos septos do tecido conjuntivo, onde convergem para formar os ductos lactíferos que drenam os lobos da glândula.



Figura 3 – Desenvolvimento do sistema de ductos em cadelas. 1-Broto primário que dará origem ao seio lactífero (DYCE *et al.*, 2004).

Histologicamente, o epitélio de revestimento dos ductos é formado por uma dupla camada de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas e à medida que vão se ramificando para formar dúctulos, o epitélio transforma-se em simples cúbico ou cilíndrico (PELETEIRO, 1994). São essas células epiteliais ductais as responsáveis pela secreção de proteínas lácteas e lipídios durante a lactação (KOLB, 1987). Os ductos, assim como os alvéolos, são circundados por células mioepiteliais contráteis, que se contraem sob a influência da ocitocina, secretando o leite (FRANDSON, 1979). Além do tecido epitelial, ainda há a presença de fibroblastos e células que compõem e sustentam o parênquima mamário. Esta formação é de extrema importância para o estudo dos tumores mamários, pois existe uma relação direta entre os componentes da lesão, devido a interação entre as células estromais e as células epiteliais. As células estromais liberam fatores de crescimento, diretamente ligados à inibição e à proliferação das células epiteliais (ZUCCARI *et al.*, 2001; BHOWMICK *et al.*, 2004).

A glândula mamária canina também é dependente de muitos fatores que fornecem sinais para a progressão dos diferentes estágios de desenvolvimento e diferenciação. Além dos hormônios como estrógeno, progesterona, prolactina e hormônios de crescimento, a matriz extracelular fornece sinais moleculares para inibir a apoptose das células epiteliais mamárias e para induzir diferenciação e transcrição de genes codificadores da proteína do leite. O contato célula-célula também mostra-se importante para vários aspectos de diferenciação e secreção do leite (PULLAN e STREULI, 1992).

Da mesma forma como ocorre na espécie humana, as glândulas mamárias dos machos consistem apenas de alguns ductos primários e secundários, mas nas fêmeas, o seu crescimento aumenta após a puberdade (DELLMANN E BROWN, 1982).

1.3. O Câncer de Mama

1.3.1. O câncer de mama em mulheres

Nas mulheres, a estrutura mamária complexa, o grande volume mamário e a grande sensibilidade às influências endócrinas predis põem esse órgão a numerosas condições patológicas. Embora a maioria das lesões mamárias seja benigna, o câncer de mama é a segunda causa mais comum de óbito por câncer, nas mulheres (KUMAR *et al.*, 2005). O câncer (neoplasia maligna ou tumor maligno) pode ser conceituado, segundo Sir Rupert Willis, como *uma massa anormal de tecido cujo crescimento é excessivo, fora da coordenação dos tecidos normais e que persiste mesmo após o término do estímulo que o evocou. É um crescimento autônomo, afin alístico e que depriva o organismo de seu suprimento energético e nutricional* (WILLIS, 1952, citado por KUMAR *et al.*, 2005).

Existem fatores que podem ter importância no câncer de mama, segundo Kumar (2005):

- **Fatores genéticos:** a incidência expressiva em parentes de primeiro grau de pacientes com câncer evidencia uma predisposição genética. Foram identificados genes de susceptibilidades para o câncer de mama. Os genes que codificam as proteínas BRCA1 (câncer de mama-1) e BRCA2 (câncer de mama-2), e que também estão associados ao câncer de ovário foram encontrados mutados em um grande número de famílias, nas quais o câncer de mama surgiram em idades jovens. Além disso, foram evidenciadas possíveis contribuições dos oncogenes e genes supressores de tumores durante o processo de evolução do câncer de mama. As mutações nos genes que codificam a proteína p53 (supressores de tumores), que designam a síndrome de Li-Fraumeni (sarcomas e carcinomas múltiplos), são responsáveis por vários casos de câncer de mama familiar.

• **Desequilíbrio hormonal:** O estrógeno endógeno em excesso desempenha um papel importante no aparecimento e na evolução do câncer de mama. As células do câncer de mama humana secretam uma variedade de substâncias que promovem o crescimento: fator de crescimento transformante (TGF- α), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF). Essas substâncias estão envolvidas em um mecanismo autócrino de progressão tumoral, já que a sua produção depende de estrógeno. Assim, acredita-se que a interação entre os hormônios circulantes, receptores hormonais nas células cancerosas e os fatores de crescimento autócrinos, induzidos pelas células tumorais, estejam envolvidos na progressão do câncer de mama. Vida reprodutiva prolongada e idade avançada ao ter o primeiro filho implicam aumento da exposição aos picos de estrógenos durante o ciclo menstrual, representando, portanto, fatores de risco.

• **Fatores ambientais:** suspeita-se de influências ambientais, devido a uma incidência variável do câncer de mama, em grupos geneticamente homogêneos, em diferentes regiões geográficas. Por exemplo, a incidência do câncer de mama é cinco vezes mais comum nos Estados Unidos do que no Japão e em Formosa (Taiwan).

Poucos tipos de cânceres foram assuntos de estudos epidemiológicos tão intensos, como o câncer de mama. As observações acerca da incidência e prevalência desta doença podem assim ser resumidas (KUMAR *et al.*, 2005):

1- **Predisposição genética:** A predisposição genética é bem definida. A magnitude do risco é proporcional ao número de parentes próximos diagnosticados com câncer de mama e a idade em que o câncer ocorreu nesses parentes. Quanto mais jovens os parentes, no momento do surgimento do câncer, e quanto maior a incidência dos cânceres bilaterais, maior a predisposição genética. Desta forma o risco é 1,5 a 2 vezes maior para mulheres com uma parente de primeiro grau, portadora de câncer de mama, e 4 a 6 vezes, para aquelas com dois parentes afetados (KUMAR *et al.*, 2005).

2- **Exposição hormonal:** A susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama encontra-se relacionada com fatores hormonais, tais como (KUMAR *et al.*, 2005):

• **Aumento com a idade:** raro antes dos 25 anos, porém, o risco aumenta com o avanço da idade.

- **Duração da vida reprodutiva:** o risco aumenta com a menarca precoce e com a menopausa tardia.

- **Parição:** mais freqüente em mulheres nulíparas do que pluríparas.

- **Obesidade:** o risco aumentado é atribuído ao armazenamento do estrógeno nos depósitos de gordura.

- **Idade ao ter o primeiro filho:** o risco é maior quando a mulher tem mais de trinta anos ao ter o primeiro filho.

- **Estrógeno exógeno:** risco moderadamente aumentado, decorrente de terapia com altas doses, para os sintomas da menopausa.

- **Anticoncepcionais orais:** não existe um aumento evidente de risco, pois há equilíbrio no conteúdo de estrógenos e progesteronas nos anticoncepcionais orais, atualmente utilizados.

3- **Falta de amamentar:** A predisposição encontra-se aumentada em pacientes que não amamentaram e que por esta razão, a glândula mamária não exerceu sua respectiva função de secretar o leite (REA, 2004).

4- **Alcolismo e tabagismo:** A ingestão regular de álcool e cigarro, mesmo que em quantidade moderada, é identificada como fator de risco para o câncer de mama, em mulheres (GUERRA *et al.*, 2005).

Os tumores malignos da mama são classificados conforme a origem do tecido envolvido (de origem epitelial ou mesenquimal). Histopatologicamente, os tumores malignos da mama são classificados de acordo com a Organização Mundial da Saúde da seguinte forma (LOPES *et al.*, 1987):

1 - Tumores de origem epitelial (carcinomas):

- não invasivos (*in situ*) - ocorrem quando as células epiteliais não ultrapassam a membrana basal;

- invasivos - ocorrem quando as células epiteliais rompem a membrana basal e invadem os tecidos adjacentes.

2 - Tumores de origem conjuntiva (sarcomas).

3 - Tumores mistos - tumores que se originam de ambos os tecidos, tanto do tecido epitelial quanto do tecido conjuntivo, e são chamados de carcinossarcomas.

4 - Outros tipos de tumores:

- Tumores cutâneos malignos - tumores originados de células da pele sobrejacente e não do parênquima mamário.

Quase todas as malignidades da mama são adenocarcinomas, de modo que tipos como carcinoma de células escamosas, tumores filóides, linfomas e sarcomas produzem menos do que cinco por cento do total. Desses, os sarcomas são os menos freqüentes (KUMAR *et al.*, 2005; STRANDBERG e GOODMAN, 1974; MARTINS *et al.*, 1984; ROSEN e OBERMAN, 1993).

Segundo Vargo-Gogola *et al.* (2007), o câncer de mama é uma doença heterogênea, que se desenvolve ao longo do tempo e por meio de mutações genéticas ou epigenéticas, ocasionando a instabilidade do genoma (Figura 4). A ação de um ou mais agentes cancerígenos, que provocam alterações no DNA, transformam as células normais em células tumorais. A carcinogênese é um processo complexo, multifásico e que culmina no surgimento de clones de células imortalizadas. Estas células adquirem a capacidade de invadir os tecidos vizinhos e de metastatizar. O processo de malignização das células da glândula mamária pode ser observado na Figura 4.

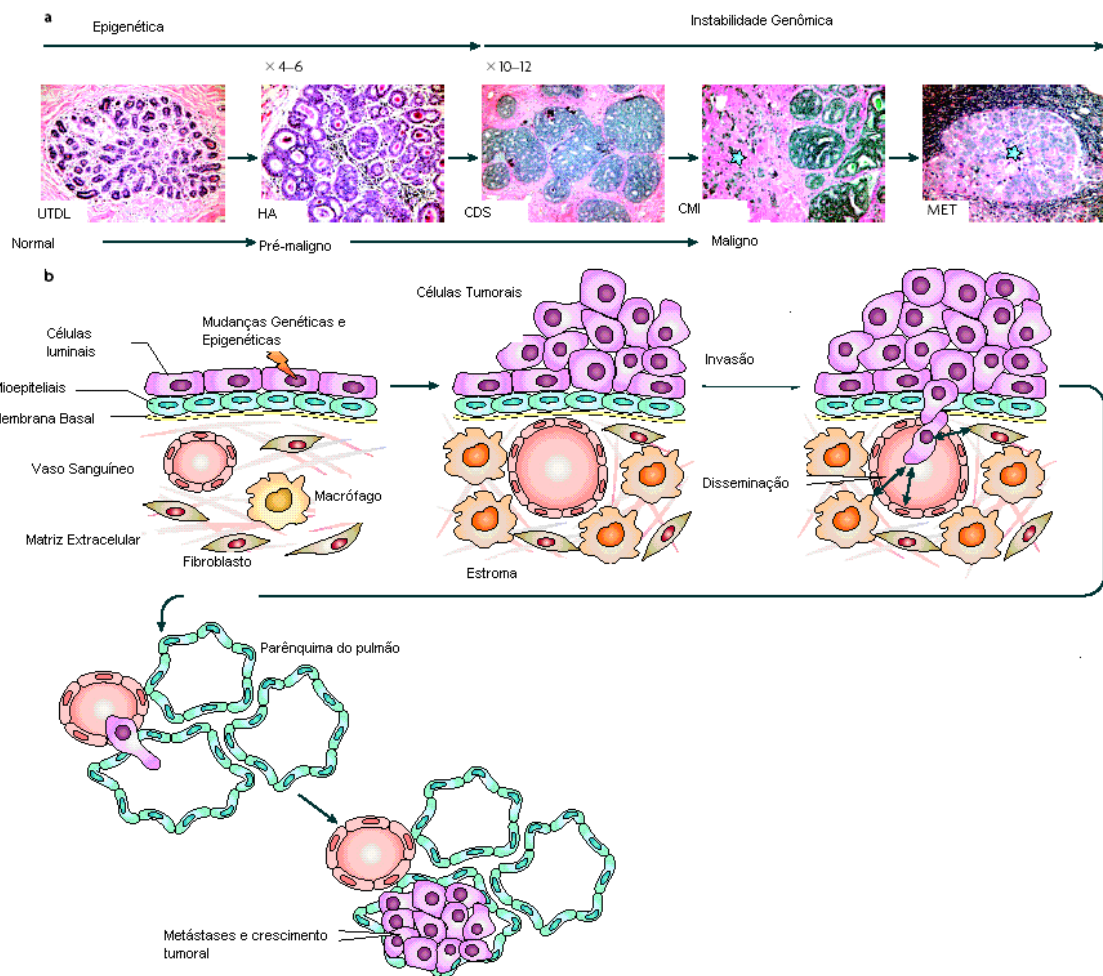


Figura 4 – Biologia do câncer de mama. (a) Carcinogênese, representada por lâminas histopatológicas. Progressão do câncer de mama. (UTDL) Unidade terminal ducto-lobular, (HA) hiperplasia atípica, (CDS) carcinoma ductal *in situ*, (CMI) câncer de mama invasivo, (MET) metástases da mama; (b) Figura esquemática da progressão do câncer de mama. As células epiteliais da mama passam por alterações genéticas ou epigenéticas, culminando em mutações. Essas células tumorais proliferam e seus clones atravessam a membrana basal, infiltram os tecidos vizinhos e invadem vasos sanguíneos, iniciando a metástases (VARGO-GOGOLA *et al.*, 2007).

1.3.2. O câncer de mama em cadelas

As neoplasias mamárias representam cerca de 50% de tumores de cadelas. São mais frequentes em fêmeas de meia-idade a velhos, sem preponderância racial (DALECK *et al.*, 1998; MARTINS e FERREIRA, 2003). A transformação neoplásica é multifatorial, mas o desenvolvimento de neoplasias mamárias na cadela é dependente, em grande parte, de estímulos hormonais. A incidência de tumor de mama é de meio por cento com castração antes do primeiro cio, oito por cento após o primeiro ciclo estral e 26% após dois ou mais ciclos, até os dois primeiros anos (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Aproximadamente 50% dos tumores mamários de cadelas são adenocarcinomas malignos (O'KEEF, 1997; DALECK *et al.*, 1998; MORRISON, 1998). Das cadelas com tumores mamários diagnosticados como benignos, cerca de 26% desenvolvem, mais tarde, tumores, em outras glândulas mamárias. Cadelas com vários nódulos podem apresentar tumores benignos e malignos concomitantemente (FAUSTINO *et al.*, 2002; MISDORP, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Como ocorre na maioria das neoplasias, a idade é um fator influente nos tumores mamários. Segundo Moulton *et al.* (1990), tumores mamários caninos são raros em cadelas com menos de dois anos de idade, no entanto, a incidência aumenta abruptamente aos seis anos, continuando a aumentar até os dez anos, quando a ocorrência começa a diminuir. São raros em cadelas com idade superior a 12 anos. O uso de anticoncepcionais à base de progestágenos tem sido associado a um pequeno aumento na incidência de tumores de mama (DONNAY *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Apesar dos tumores de mama em cadelas serem frequentes, há controvérsias sobre os fatores que influenciam o seu desenvolvimento (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Os tumores mamários espontâneos dos caninos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e aparentemente genéticas, semelhantes aos da espécie humana. Destas, podem ser citadas: a faixa etária de surgimento, a morfologia (MOULTON, 1990), o efeito protetor da ovariectomia (GERALDES *et al.*, 2000), a presença de receptores de estrógeno (GERALDES *et al.*, 2000), os órgãos-alvo das metástases, a evolução clínica das neoplasias (MOULTON, 1990) e a hereditariedade, em alguns casos (MOULTON *et al.*, 1970). Também foi demonstrado que as neoplasias mamárias de cães apresentam

fenótipo antigênico, comparável àquele observado em lesões de mama em homens e mulheres (MOTTOLESE *et al.*, 1994), e que há homologia entre os genes BRCA-1 humano e canino (SZABÓ *et al.*, 1996). Por esta razão, tem-se proposto o estudo dessas lesões em cães como modelo comparativo para a espécie humana, em lugar de pequenos animais de laboratórios, devido maiores semelhanças entre as características tumorais (FAUSTINO *et al.*, 2002; MARTINS e FERREIRA, 2003).

participam diversos tipos celulares e moléculas e nele se destacam os anticorpos conhecidos como imunoglobulinas (CALICH e VAZ, 2001).

Os anticorpos são imunoglobulinas que, por sua vez, são glicoproteínas (Figura 5), sintetizadas por plasmócitos, derivados de linfócitos B. Após um estímulo antigênico, os anticorpos interagem com os antígenos de maneira específica (CALICH e VAZ, 2001). As imunoglobulinas reconhecem a forma de determinadas seqüências de aminoácidos, contidas na estrutura do antígeno (epítomos), e ativam os processos que o neutralizam e que o eliminam (KOHLE e MILSTEIN, 1975). Pelo fato de os anticorpos interagirem de maneira específica com os antígenos, estudos possibilitaram o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, o que foi estabelecido no final da década de 50, por meio da teoria da seleção clonal (BURNET, 1957) (Figura 6). Desde então, têm sido largamente empregados em métodos diagnósticos (BERRY, 2005), como produtos terapêuticos, em especial no tratamento do câncer (CAMPBELL, 1991; BERRY, 2005), e como reagentes, em pesquisa. Além disso, são muito úteis para a identificação de proteínas específicas de células (marcadores fenotípicos moleculares) e são utilizados em vacinas recombinantes (BERRY, 2005).

Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas com alta especificidade antigênica e são moléculas homogêneas (CALICH e VAZ, 2001), produzidas a partir de um único clone de linfócitos B, imortalizado (KOHLE e MILSTEIN, 1975). O seu uso justifica-se pelo fato de que os hibridomas (produtos da fusão de células tumorais de mieloma com linfócitos B normais) possuem a enorme vantagem de permitir a produção de quantidade ilimitada do mesmo anticorpo. Além disso, têm facilidades como congelamento e estocamento, por vários anos, sem que ocorram alterações nas suas características biológicas. Outra vantagem é o fato de se poder utilizar camundogos para a produção dos anticorpos monoclonais, pois são de fácil manuseio. Um anticorpo monoclonal reconhece especificamente um único epítomo em um antígeno e este fato pode influenciar tanto positivamente quanto negativamente, quando se trata de diagnósticos. O aspecto positivo diz respeito à especificidade do teste, que só reconhecerá o antígeno que contenha aquele epítomo; e o negativo, quando se trata da reação à sensibilidade do teste, ou seja, não ser capaz de reconhecer variantes do mesmo antígeno ou ainda, se a quantidade de epítomo for pouca na superfície do antígeno (CAMPBELL, 1991).

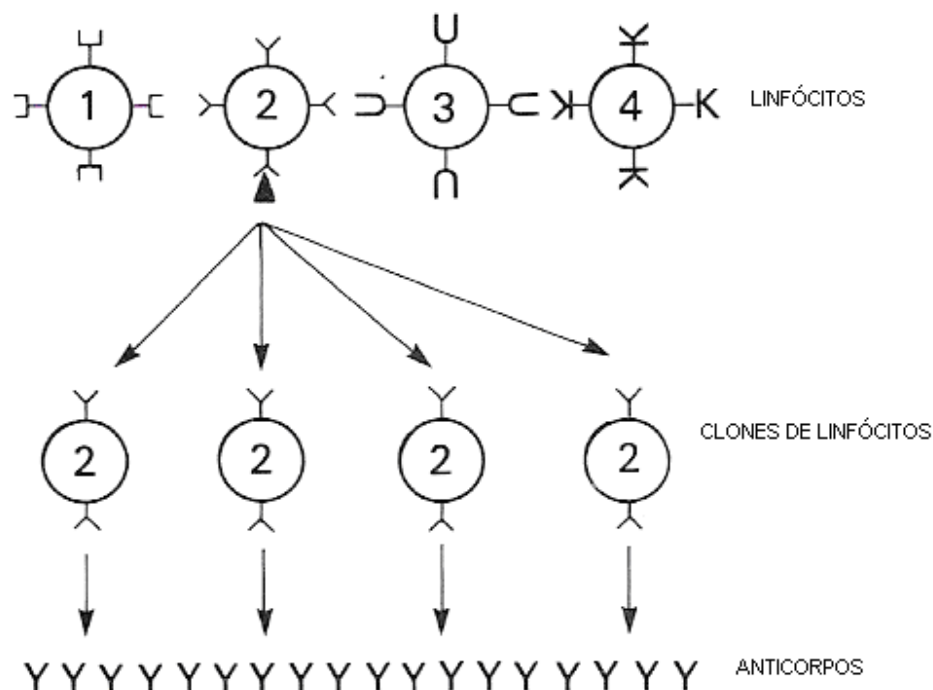


Figura 6 – Seleção clonal de linfócitos (GODING, 1986)

1.4.2. O ensaio imuno-histoquímico

A partir de 1960, vêm surgindo técnicas que empregam imunoglobulinas marcadas com enzimas. No local da reação, se forma um composto, que é gerado pela ação da enzima sobre um substrato apropriado e que, quase sempre, produz visualização colorimétrica. Esta enzima geralmente é a peroxidase, razão pela qual se fala muito em imunoperoxidase. A enzima atua sobre peróxido de hidrogênio (H_2O_2), promovendo a transferência de elétrons, a partir de uma substância cromógena, que se precipita como um pigmento insolúvel, em geral, a diaminobenzidina (DAB) (BRASILEIRO FILHO, 2004 b).

No ensaio imuno-histoquímico, células em cultura ou cortes de tecido, que se suponha conter uma proteína, são incubados com o anticorpo que reconhece esta proteína específica (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004 b). Segundo Brasileiro Filho (2004 b), as enzimas podem ser acopladas pelo método direto (anticorpo primário) ou pelo método indireto (anticorpo secundário). No método direto, é utilizado somente um anticorpo primário, ligado ao composto de detecção. Isso significa que o anticorpo possui o

composto de detecção que se liga diretamente ao antígeno. No método indireto, são utilizados dois anticorpos, o primário e o secundário. O anticorpo primário é aquele que reagirá especificamente com o antígeno que se quer detectar e o anticorpo secundário (anti-anticorpo), ligado ao composto de detecção, se ligará ao anticorpo primário. Portanto, o anticorpo secundário, composto de detecção, vai se ligar ao anticorpo primário que, por sua vez, estará ligado ao antígeno (BANCROFT *et al.*, 1996).

Encontram-se disponíveis anticorpos de grande importância clínica, eficazes para a detecção de neoplasias malignas, como, por exemplo, os anticorpos monoclonais, como o 32-2B, o anti-HER2, entre outros. Estes anticorpos monoclonais e o desenvolvimento de métodos imuno-histoquímicos de alta sensibilidade têm contribuído muito para os avanços do conhecimento científico e para reconhecimento e diagnóstico Histopatológico de grande número de doenças. As entidades patológicas que mais têm recebido os benefícios dessa técnica, seja com relação ao diagnóstico mais preciso, seja com relação à etiopatogênese, são as neoplasias e as doenças infecciosas (BRASILEIRO FILHO, 2004 b).

1.4.3. Caracterização do câncer de mama por imuno-histoquímica

A classificação dos tumores, com critérios histogenéticos e de acordo com o grau de diferenciação das células, tem grande utilidade na aplicação prática (BANCROFT *et al.*, 1996). Neste sentido, a imuno-histoquímica tem contribuído de forma notável para a classificação precisa de muitas neoplasias, por meio do uso de marcadores antigênicos de diferenciação fenotípica, identificáveis por meio de reações com seus anticorpos específicos. Nesses casos, a utilização de anticorpos monoclonais distingue, por exemplo, um carcinoma indiferenciado de um tumor mesenquimal (BRASILEIRO FILHO, 2004 b).

Nas neoplasias mamárias humanas, a imuno-histoquímica realizada com anticorpos monoclonais tem importância fundamental na pesquisa de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e fatores de crescimento, como EGF (MEUTEN, 2002). É sabido que existe uma íntima relação entre o número desses receptores e a capacidade proliferativa das células neoplásicas em alguns tumores de mama (COSTA *et al.*, 2002), com conseqüentes implicações prognósticas e terapêuticas.

Em cadelas, obteve-se resultados similares, tanto pela maior expressão de marcadores imuno-histoquímicos, para avaliar proteínas relacionadas com a proliferação celular nos tumores malignos, principalmente nos menos diferenciados, quanto pela correlação inversa, ou seja pela menor expressão de imunomarcadores para receptores de estrógeno e de progesterona (CASSALI, 2000).

O comportamento biológico do câncer de mama está associado à expressão de receptores celulares, de modo que, sua pesquisa tem relevância para a orientação terapêutica. Além disso, a imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais tem sido um instrumento de grande valor, pois estes têm auxiliado na identificação de sítios de ligação em tumores primários e tumores metastáticos (BRASILEIRO FILHO, 2004 b).

Por meio de estudos relacionados com imunomarcadores para receptores hormonais, receptores de fatores de crescimento (HER2, EGF) e moléculas de adesão, como as caderinas, novas terapias estão sendo desenvolvidas para proporcionar melhores condições de vida aos pacientes (GAMA *et al.*, 2008). Atualmente encontra-se no mercado o Trastuzumab (Herceptin), anticorpo monoclonal, administrado em pacientes com câncer de mama, que *superexpressam* HER2 (MILES, 2001), o qual é administrado após o diagnóstico revelado por imunomarcadores.

1.4.4. O Anticorpo monoclonal anti-desmogleína-1 (32-2B) como marcador epitelial.

Os desmossomas do grego, ‘desmos’ (ligado, ligação) e ‘soma’ (corpo) – são estruturas intercelulares, de adesão altamente especializada, presentes em tecidos epiteliais, músculo cardíaco e meninges que interagem com os filamentos intermediários do citoesqueleto de células adjacentes (COWIN e GARROD, 1983; MATTEY e GARROD, 1986; SUTER *et al.*, 1997; SCOTT *et al.*, 2001; GARROD e CHIDGEY, 2007; CHIDGEY e DAWSON, 2007; OLIVEIRA, 2008). Eles conferem às células forte adesão (Figura 7) e contribuem para a manutenção da integridade dos tecidos, além de grande resistência a estresses mecânicos (CHIDGEY e DAWSON, 2007; OLIVEIRA, 2008).

Os desmossomas são formados (ultraestruturalmente) por duas placas intracelulares de cerca de 40 nm de espessura, dispostas em paralelo, separadas por um espaço entre as membranas plasmáticas vizinhas de cerca de 30 nm. A placa intracelular é dividida em

duas regiões: região próxima à membrana (placa densa externa), com cerca de 20 nm de espessura, e a região mais afastada da membrana (placa densa interna), com menos de 10 nm de espessura (GARROD e CHIDGEY, 2007). A placa densa externa constituída pelos domínios intracelulares das caderinas desmossômicas, além de duas proteínas da família armadilo, placoglobina e placofilina. A placa densa interna, por sua vez, é composta de desmoplaquina, que atua como sítio de ancoragem para os filamentos intermediários do citoesqueleto (GARROD e CHIDGEY, 2007) (Figura 8).

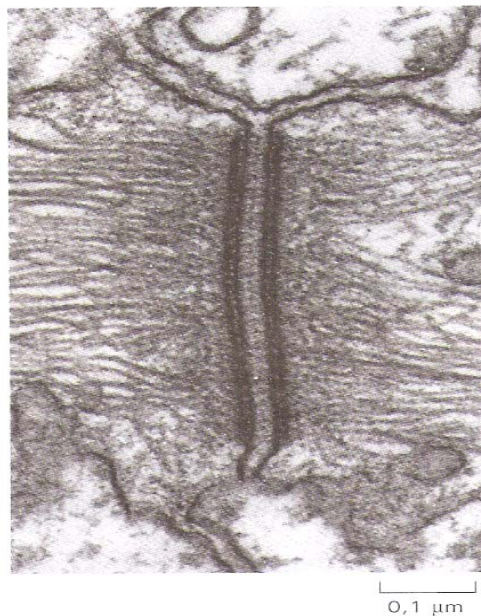


Figura 7 – Desmossoma. Eletromicrografia de uma junção desmossômica ligando duas células da epiderme de uma salamandra (ALBERTS *et al.*, 2004).

Os desmossomas são constituídos por proteínas de várias famílias, tais como: plaquinas (desmoplaquinas), armadilo (placoglobinas e placofilinas) e caderinas (desmogleínas e desmocollinas) (Figura 8), que foram caracterizadas como componentes estruturais dos desmossomas em humanos e em animais (SUTER *et al.*, 1997; CHIDGEY e DAWSON, 2007). As desmoplaquinas estão bem estabelecidas como principal proteína de ligação entre o complexo caderina desmossômica-placoglobina e filamentos intermediários, enquanto que as placoglobinas e as placofilinas são proteínas

citoplasmáticas e possuem papel estrutural, pois agem como moléculas de sinalização. Elas possuem sítios de ligação que interagem com as caderinas desmossômicas (CHIDGEY e DAWSON, 2007; GARROD e CHIDGEY, 2007).

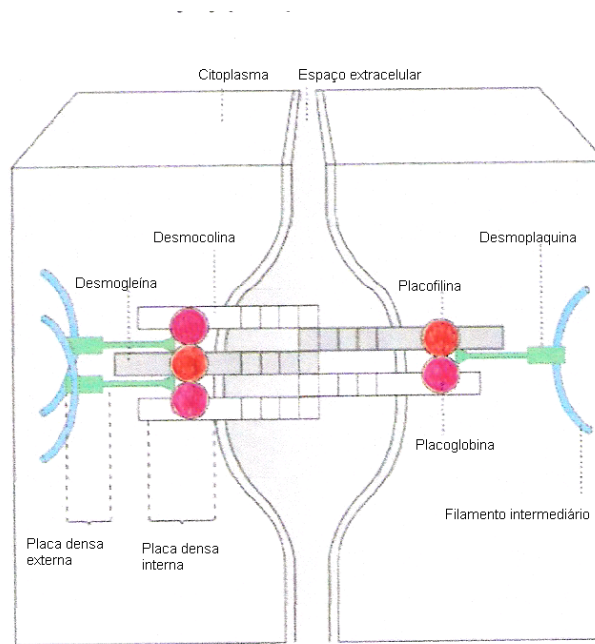


Figura 8 – Estrutura esquemática de componentes do desmossoma (WASCHKE, 2008).

As caderinas desmossômicas, são glicoproteínas transmembranas que acoplam as duas metades dos desmossomas nos espaços intercelulares (CHIDGEY e DAWSON, 2007) (Figura 8). Elas possuem alta dependência de cálcio e são essenciais para a adesão desmossômica (VILELA *et al.*; 1995; OLIVEIRA, 2008). Em humanos há sete caderinas desmossômicas, três desmocolinas (Dsc 1-3) e quatro desmogleínas (Dsg 1-4). Todos os desmossomas possuem pelo menos uma desmocolina e uma desmogleína, de modo que ambas são necessárias para a adesão (GARROD e CHIDGEY, 2007; DUSEK *et al.*, 2007) celular. Os níveis de expressão das várias isoformas das proteínas desmossômicas, contudo, varia de acordo com o tipo celular, e com a camada tecidual em que são encontradas (DUSEK *et al.*, 2007)

Dentre as caderinas, a desmogleína é muito conhecida, por sua relação com doenças auto-imunes, como o pénfigo, caracterizado por afecções bolhosas crônicas, que se formam como resposta a auto-anticorpos dirigidos contra as desmogleínas (YANCEY,

2005). A alteração da expressão dessa caderina desmossômica, durante a carcinogênese, permite também sua utilização como antígeno-alvo, para detectar se houve perda da adesão e a capacidade de invasão de células neoplásicas em tecidos adjacentes, tanto na espécie humana quanto na espécie canina (STEEVES *et al.*, 2002; CHIDGEY, 2002).

Vilela *et al.* (1987) desenvolveram um anticorpo monoclonal específico (32-2B) para uma proteína desmossômica, a desmogleína-1. Este anticorpo foi produzido pela imunização de camundongos com a desmogleína (uma mistura de isoformas purificada da epiderme nasal de bovinos) e provou ser um marcador seguro para identificar carcinomas.

Vários estudos foram realizados com o anticorpo 32-2B, visando correlacionar a expressão dessa molécula de adesividade celular (CAM), com o grau de diferenciação celular e com a capacidade de invadir e metastatizar para linfonodos regionais, além de outros tecidos e órgãos. Por exemplo, Conn *et al.* (1990), estudando a expressão da desmogleína-1 em carcinomas de células transicionais da bexiga e usando o anticorpo monoclonal 32-2B, observaram correlação negativa entre a intensidade de coloração desmossômica e o grau de invasão. Natsugoe *et al.* (1994), também estudando a associação da expressão da desmogleína e os achados clinicopatológicos do câncer de esôfago, constataram que, quanto menor a expressão de desmogleína, maior a capacidade de invasão. Assim a expressão da desmogleína pode ser um fator significativo para a aquisição do fenótipo invasivo e/ou metastático e pode ser usada como valor prognóstico nesse tipo de câncer. Harada *et al.* (1996) e Imai *et al.* (1995) estudaram a expressão da desmogleína em carcinomas de células escamosas da cavidade oral e observaram que, quanto menor a expressão da desmogleína, maior a perda de diferenciação do tecido e maior a invasão a outros tecidos. Krunic *et al.* (1998), utilizando o anticorpo monoclonal 32-2B, com o objetivo de distinguir o queratoacantoma do carcinoma de células escamosas, também demonstraram que a expressão de desmogleína era intensa em tumores bem diferenciados e ausente em tumores pouco diferenciados, ou seja, a expressão da desmogleína diminuía com a perda da diferenciação do tecido. Ishii *et al.* (2004), utilizando o anticorpo 32-2B para estudar o pênfigo, conseguiram demonstrar as diferentes localizações da desmogleína-1, devido à presença de espaços intercelulares nas regiões desmossômicas.

Portanto, o uso do anticorpo monoclonal 32-2B em células normais e cancerosas da mama das espécies humana e canina pode servir de base para a compreensão da expressão da desmogleína-1, durante o processo de malignização. Até o presente momento, não foram encontrados relatos de pesquisas que relacionem a expressão da desmogleína-1, em que foram comparadas células normais e células cancerosas, de mulheres e de cadelas.

1.5. Cultura de Células

A cultura de células corresponde a um conjunto de técnicas com o objetivo de manter vivas as células que foram desagregadas do tecido original. A cultura pode ser em monocamada ou em suspensão. A principal vantagem da cultura de células é o controle preciso do ambiente físico-químico (temperatura, umidade, pressão osmótica e tensão de O₂ e CO₂) (FRESHINEY, 2000). Também permite o estudo da biologia tumoral de maneira controlada e a pesquisa de substâncias inibidoras do crescimento neoplásico.

As linhagens celulares constituem modelos experimentais adequados para a investigação da tumorigênese, da diferenciação, da resposta a tratamento, da regulação genética e da caracterização do crescimento de células em cultura (VILELA *et al.*, 1995; VILELA *et al.*, 1998; VARGO-GOGOLA *et al.*, 2007). Por estas razões, os experimentos com cultura de células constituem um importante meio de análise do fenômeno neoplásico e da biologia tumoral.

As culturas primárias são aquelas obtidas diretamente dos tecidos ou de fragmentos de órgãos. São heterogêneas, com células de crescimento finito e muito propícias a contaminações microbianas. Já as linhagens celulares que podem ser obtidas a partir das culturas primárias são caracterizadas por alterações genéticas, que conferem às células o crescimento rápido e contínuo e, dessa forma, permitem que elas atinjam o potencial aparentemente “infinito” de divisão e se tornem “imortalizadas”. Entretanto, essas características podem ser limitadas a um número de passagens, ou seja, em cultura, a medida que as células estão se proliferando, elas vão sendo repicadas (transportadas de um frasco para outro). Nesse caso, as células permanecem viáveis por algum tempo, quando começam a apresentar sinais morfológicos de degeneração. As células crescem por várias divisões, mas depois entram numa fase crítica, em que muitas delas morrem. Em

contrapartida, as células que superaram a fase crítica tornam-se estáveis para formar uma linhagem celular (LEWIN, 1996).

Na cultura primária, o termo *normal* implica que as células foram derivadas de um fragmento de tecido ou órgão saudável, normal, sem tumor ou outra lesão patológica. Na linhagem celular, células normais, comumente exibem certas propriedades, tais como:

- **Dependência de ancoragem:** células ancoragem-dependentes ou substrato-dependentes necessitam se ligar a uma superfície sólida, a fim de sobreviverem, proliferarem e expressarem suas diferentes funções (MCDONALD, 1996).

- **Cultura em monocamada:** O termo cultura em monocamada descreve a distribuição das células como uma única camada sobre um substrato (MCDONALD, 1996).

- **Dependência de soro:** O soro é necessário para fornecer fatores de crescimento essenciais *in vitro* (LEWIN, 1996).

- **Inibição densidade-dependente:** muitas linhagens de células normais exibem redução notável da atividade proliferativa correlacionada com o estabelecimento da confluência, isto é, ocupação de toda a superfície disponível no substrato dos frascos. Segundo McDonald (1996) esse processo é resultado da densidade populacional. No entanto Lewin (1996) acredita que o crescimento é inibido por processos que envolvem contatos célula-célula, em razão da produção de substâncias inibidoras, chamadas calonas.

- **Senescência das células *in vitro*:** Linhagem de células normais, em geral, têm vida finita, ou seja, elas não se multiplicam além de um número finito de gerações de células. Em linfócitos humanos este número corresponde a cerca de 40 vezes.

As células normais em cultura apresentam, tipicamente, um modelo de curva de crescimento sigmóide, que reflete a adaptação à cultura, o suprimento nutricional necessário para sustentar a produção de novas células e as condições ambientais e do substrato. Após a introdução das células em cultivo *in vitro*, elas passam por uma fase na qual não se dividem (fase lag); depois, atingem um período de atividade proliferativa, onde o número de células aumenta exponencialmente (fase logarítmica - log). Então, na fase do platô, a proliferação celular cessa e a população atinge a confluência. Finalmente, um período de declínio no número de células segue-se à fase de platô como consequência de morte celular (MCATEER e DAVIS, 1996; VILELA *et al.*, 2007).

Células transformadas não são células normais. A transformação *in vitro* é a aquisição de características ou propriedades que podem ser descritas, tanto em termos moleculares quanto celulares. As células transformadas crescem de maneira muito menos restrita em relação as células normais, tais como:

- Possuem habilidade de formar colônias em ágar-mole, perdem a inibição densidade-dependente da proliferação celular e têm necessidade de ancoragem (MCDONALD, 1996).

- empilham-se, constituindo uma massa espessa de células, ao invés de se tornarem restritas a uma monocamada (MCDONALD, 1996);

- possuem dependência reduzida de soro (LEWIN, 1996; LOPES *et al.*, 2005).

A transformação celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por uma variedade de eventos, derivados do meio ambiente ou de transformações genéticas (MCDONALD, 1996; LEWIN, 1996). Exposições a certos produtos químicos carcinógenos, radiações, transfecção com retrovírus ou DNA de vírus tumorais, oncogenes e genes supressores de tumor convertem as células normais em células transformadas (LEWIN, 1996; LOPES *et al.*, 2005).

Apesar das células transformadas apresentarem características das células cancerosas (a imortalidade) as células cancerosas se diferem das células transformadas por serem capazes de produzir tumores primários e gerar metástases, quando inoculadas em animais de experimentação (MCDONALD, 1996; LEWIN, 1996; LOPES *et al.*, 2005).

Linhagens de células cancerosas da mama têm sido usadas como modelo, para a compreensão da proliferação celular e da apoptose. O estudo do comportamento dessas linhagens resulta em modelos valiosos, para o entendimento das vias de sinalização metabólicas, relacionadas com a proliferação e a diferenciação celulares. Esses estudos podem auxiliar no aprimoramento de técnicas de prevenção, diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes com câncer de mama.

II. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Comparar características morfológicas de células normais e cancerosas, derivadas de glândulas mamárias das espécies humana (mulheres) e canina (cadela). Além disso, analisar a expressão de uma molécula de adesão celular, presente nos desmossomas, a desmogleína-1.

Objetivos Específicos

- Analisar morfolologicamente as células mamárias normais das espécies humana e canina, por meio de microscopia de luz;
- Diagnosticar e classificar os tumores provenientes das espécies humana e canina;
- Comparar características morfológicas de células normais e cancerosas, derivadas de glândulas de ambas as espécies, por meio da cultura de células;
- Tentar estabelecer e caracterizar linhagens de células epiteliais mamárias normais e cancerosas provenientes das espécies humana e canina *in vitro*;
- Analisar a expressão da desmogleína-1, utilizando o anticorpo monoclonal anti-desmogleína-1 (32-2B), por meio da técnica de imuno-histoquímica com uso de avidina-biotina.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ética

A metodologia desse trabalho foi submetida ao Comitê de Ética para estudos em seres humanos da Universidade Federal de Viçosa e aprovada no processo número 038/2008. Também foi submetida ao Comitê de Ética para estudos relacionados com animais e aprovada no processo número 033/2008.

3.2. Coleta do material

A despeito dos diversos subtipos histológicos dos tumores mamários humanos (OMS) e caninos (MISDORP *et al.*, 1999), reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde, utilizaram neoplasias genericamente classificadas como adenocarcinomas. Foram coletados seis fragmentos do parênquima mamário normal humano, por meio de mamoplastias, realizadas na Clínica de Cirurgia Plástica, sob a responsabilidade do Dr. Renato Del Giúdice, enquanto que foram coletados três amostras de tumores malignos, provenientes da espécie humana, as quais foram obtidas por meio de punção aspirativa por agulha grossa (*core biopsy*), na Clínica de Cirurgia Plástica Paulo Saraiva, sob a responsabilidade do Dr. Jackson Roberto de Moura, ambas na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

As amostras de parênquima mamário canino, normal e tumoral, foram obtidas por cirurgias realizadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, sob a responsabilidade do professor Dr. Ricardo Junqueira Del Carlo e da cirurgiã Tatiana Schmitz Duarte. Foram coletados 10 fragmentos normais da mama e 14 fragmentos de tumores malignos, no período de março de 2007 a junho de 2008. As cadelas possuíam de 6 a 15 anos de idade e não houve distinção racial.

3.3. Transporte e coleta do material

Após a remoção cirúrgica, os fragmentos de tecidos normais da mama e os de tumores malignos de ambas as espécies foram transportados para o Laboratório do Câncer da UFV, dentro de frascos estéreis que continham 10 ml de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) suplementado (8 ml de meio de cultura DMEM; 2ml de soro fetal bovino; 1 ml de solução de antibióticos, Penicilina/estreptomicina/Fungizona; 20 µl de hidrocortisona; 0,1 µl Fator de Crescimento Epidermal; 0,1 µl de insulina, 0,1 µg de cólera toxina). As Outras partes dos mesmos fragmentos foram transportadas em frascos com formaldeído tamponado 10% em PBS, para serem processados e incluídos em parafina (ver o protocolo em anexo).

3.4. Cultura primária

Após a coleta (citada no subitem 3.3.), os fragmentos da mama normal e da cancerosa, de ambas as espécies, foram debridados em capela de fluxo laminar, a fim de serem retiradas as áreas com necrose, hemorragia e tecido adiposo, obtendo-se predominantemente o parênquima mamário. Em seguida, os tecidos foram fragmentados com o auxílio de lâminas de bisturi, usadas em pares, duas em cada mão e, após os fragmentos serem cortados, por meio de movimentos opostos e no mesmo plano, foram obtidos fragmentos menores de aproximadamente 1 mm x 1 mm chamados *explantes*. Estes explantes foram inseridos dentro dos frascos de cultura, com o auxílio de seringas de 1 ml. Em seguida, foi realizada a técnica da gota invertida e, então, as culturas foram acondicionadas a 37°C, 5% de CO₂ e 70% de umidade, sendo rotineiramente observadas em microscópio de luz invertida (Leica DMIL).

3.5. Técnica da gota invertida

Utilizando seringas de 1 ml, cerca de dez a vinte explantes foram colocados em duas fileiras equidistantes, com separação de cerca de 0,5 cm um do outro, em garrafas de poliestireno de 25 cm². Sobre cada explante foi adicionada uma gota de meio de cultura suplementado (subitem 3.3) e, em seguida, as garrafas foram acondicionadas de forma invertida por 24 horas. Após esse período, as garrafas foram colocadas na posição normal.

O meio de cultura suplementado foi acrescentado aos explantes, aumentando o volume da pequena gota inicial e, nos dias seguintes, o volume do meio foi suficiente para cobrir totalmente todos os explantes. Esta técnica está descrita em Freshney (2000) e modificada no Laboratório do Câncer-UFV.

3.6. Cultura de células provenientes dos tecidos normais e cancerosos da mama humana e canina

Quando as células começaram a se soltar dos explantes e a se aderirem ao substrato da garrafa de cultura, formando agregados celulares, foram mantidas até atingirem a semiconfluência. Como a glândula mamária de ambas as espécies é constituída de mais de um tipo tecidual (epitelial, conjuntivo), as células que migravam dos explantes para o substrato da garrafa possuíam o formato epitelíóide e fibroblatóide. Com o propósito de separar as células epitelíóides das células fibroblastóides foi realizada uma tripsinização branda, a fim de manter em cultura apenas as células epitelíóides. A partir de então, as células epitelíóides que mantiveram aderidas ao substrato, permaneceram nas mesmas garrafas de cultura e foram cultivadas rotineiramente com o objetivo de atingirem a semiconfluência e então serem repicadas (passadas) até se tornarem uma linhagem estável (imortalizada) de células epitelíóides. Isto acontece quando se realizam pelo menos 40 passagens (repiques) de células.

As células fibroblastóides retiradas da cultura inicial foram transferidas para outro frasco de cultura e cultivadas rotineiramente (4,5 ml meio de cultura DMEM suplementado com 0,5 ml de soro fetal bovino). Com o objetivo de proporcionar um melhor ambiente para as células epitelíóides mantidas na garrafa original, era adicionado 1 ml do meio de cultura das células fibroblastóides, pois este meio de cultura era condicionado pelas células fibroblastóides e então possuía substâncias como por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos que estimula a proliferação das células epitelíóides. Então, o meio de cultura das células epitelíóides era condicionado com 1 ml de meio de cultura (DMEM suplementado, citado no item 3.3), 1 ml do meio de cultura (DMEM suplementado com soro fetal bovino) contido na garrafa de cultura das células fibroblastóides e 3 ml do meio de cultura que já estava no frasco em que permaneciam as células epitelíóides.

3.6.1. Tripsinização branda

Para se obter uma cultura pura de células epiteliais, realizou-se uma tripsinização branda para remover as células fibroblastóides que estão frouxamente aderidos ao substrato, ao contrário das células epitelióides. Logo após, os meios de cultura foram retirados das garrafas e em seguida as células epitelióides foram lavadas com PBS (3X). Depois, foram adicionados 0,5 ml de tripsina, diluída em 0,5 ml de PBS (tripsina 0,125%). Este tratamento durou cerca de dois a três minutos, tempo suficiente para a retirada das células fibroblastóides. A interrupção desse processo se deu com a adição de 5 ml de meio de cultura, suplementado com 1,25 ml de soro fetal bovino.

3.7. Preparo do material para avaliação histopatológica

Fragmentos normais e cancerosos de mama, das espécies humana e canina (ver subitem 3.2.), foram fixados em formaldeído 10% tamponado, por até 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Técnica utilizada na rotina histológica do laboratório de Biologia Estrutural da UFV (TOLOSA *et al.*, 2003).

Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados na espessura de 3µm em micrótomo retativo (Leica, 2045) e em seguida corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Azul de Toluidina e Tricrômico de Gomori. Só então foram analisados em microscópio de luz (ver o protocolo detalhado em Anexos).

Os tumores malignos de ambas as espécies foram diagnosticados e confirmados por dois patologistas, o professor Doutor Marcelo José Vilela e a professora Doutora Marlene Isabel Vargas Vilorio, e classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde.

3.8. Preparo do material para imuno-histoquímica

Após a inclusão em parafina (citada no subitem 3.7.), os fragmentos da mama normal e da cancerosa, de ambas as espécies, foram cortados em micrótomo com espessura de 3µm e os cortes foram fixados nas lâminas (técnica descrita por Hsu *et al.*, 1981 e modificada por Vilela *et al.*, 1987).

Foi utilizada a técnica avidina-biotina-peroxidase, utilizando-se o anticorpo monoclonal 32-2B (anti-desmogleína-1). As preparações foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em álcool 70%, por dez minutos. Em seguida foram incubadas com 1,0% H₂O₂ em metanol, por vinte minutos, e lavadas com água destilada. Logo após a lavagem, foram tratadas com 0,1% de tripsina (Biobrás) em 0,1% de CaCl₂, por vinte minutos, lavadas com TBS e incubadas em 1% de soro albumina bovina + meio de cultura DMEM + 20% de soro fetal bovino, por trinta minutos. Após a lavagem com TBS, foi aplicado o anticorpo primário anti-desmogleína (32-2B), por uma hora, e as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-mouse IgG biotinilado, também por uma hora. Logo após, as lâminas foram novamente lavadas com TBS e incubadas com o complexo avidina-biotina peroxidase (ABC), por quinze minutos (Kit Vectastain-Vector). Finalizando, aplicou-se o substrato DAB (Diaminobenzidina), por dez minutos (kit DAKO), e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina por três minutos (ver todo o processo detalhados em anexos).

3.9. Obtenção das imagens

3.9.1. Imagens referentes às células em cultura

Durante a fase experimental, as células normais e cancerosas da mama das espécies humana e canina, em cultura, foram registradas por meio de uma câmera digital Sony (modelo Cyber-Shot, 5.1 Mega Pixels,) acoplada ao microscópio de luz invertida (Leica, DMIL).

3.9.2. Imagens referentes às análises histológica, histopatológica e imuno-histoquímica.

A captura de imagens e a documentação fotográfica foram realizadas em um microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical), equipado com sistema U-Photo e com câmera digital acoplada (modelo Spot Insightcolour 3.2.0).

IV. RESULTADOS

4.1. Avaliação histológica e histopatológica dos fragmentos normais e cancerosos da mama das espécies canina (cadela) e humana (mulheres)

4.1.2. Avaliação histológica e histopatológica em cadelas

As características morfológicas da mama normal de cadelas, podem ser evidenciadas pela coloração com hematoxilina e eosina (Figura 9).

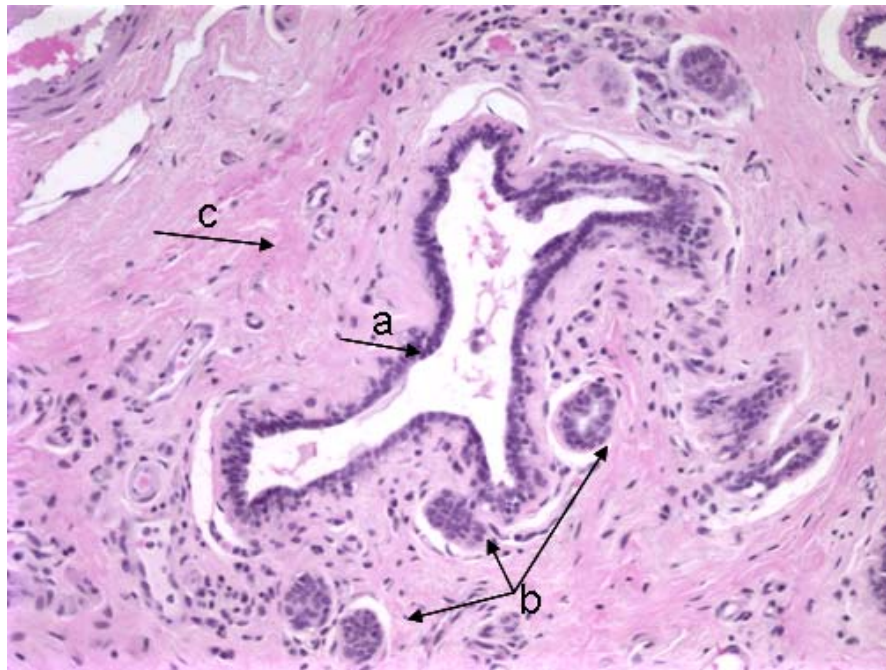


Figura 9 – Imagem microscópica de mama normal de cadela, mostrando algumas de suas características histológicas fundamentais: (a) túbulo; (b) Alvéolos; (C) Tecido conjuntivo denso. Coloração com hematoxilina e eosina (400X no microscópio)

As classificações dos subtipos histopatológicos de tumores malignos encontrados nas cadelas analisadas neste trabalho podem ser visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação de subtipos histopatológicos de tumores provenientes da glândula mamária de cadelas, para o presente estudo (MISDORP *et al.*, 1999)

Caso	Subtipo Histopatológico
1	Adenocarcinoma misto com melanose (carcinossarcoma)
2	Adenocarcinoma papilar pouco diferenciado misto, com áreas sólidas
3	Carcinossarcoma, com inúmeros mastócitos presentes (mastocitose)
4	Adenocarcinoma misto
5	Adenocarcinoma pouco diferenciado
6	Adenocarcinoma tubular simples
7	Adenocarcinoma intraductal
8	Adenocarcinoma tubular misto
9	Adenocarcinoma tubular simples
10	Adenocarcinoma tubular bem diferenciado
11	Adenocarcinoma tubular misto
12	Adenocarcinoma tubular simples
13	Adenocarcinoma tubular bem diferenciado
14	Adenocarcinoma papilar misto, com áreas sólidas

4.1.3. Avaliação histológica e histopatológica em mulheres

A Figura 10 mostra os resultados obtidos com a coloração histológica dos fragmentos da mama normal de mulheres, realizada com hematoxilina e eosina. Estes resultados demonstraram semelhanças aos resultados obtidos com os fragmentos provenientes da mama normal de cadelas (Figura 9).

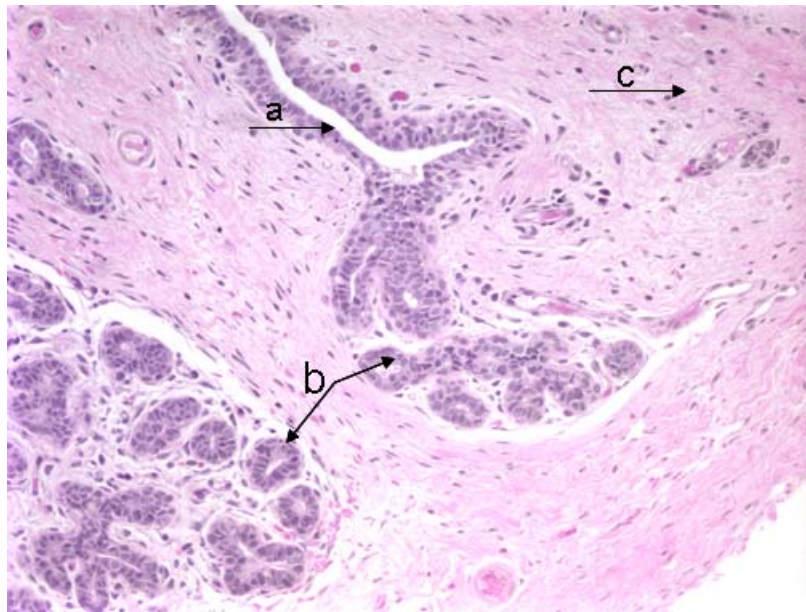


Figura 10 – Imagem microscópica da mama normal de mulheres, mostrando algumas de suas características fundamentais: (a) túbulo; (b) alvéolos; (C) Tecido conjuntivo denso. Coloração com hematoxilina e eosina (200X no microscópio). Observar semelhança com a Figura 9.

As classificações dos subtipos histopatológicos de tumores malignos encontrados nas análises para a realização deste trabalho podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação dos subtipos de tumores provenientes da glândula mamária de mulheres, para o presente estudo (OMS).

Caso	Subtipo Histopatológico
1	Adenocarcinoma tubular
2	Adenocarcinoma tubular
3	Adenocarcinoma tubular

4.1.4. Colorações especiais

Para auxiliar nas classificações dos subtipos dos tumores, foram realizadas duas colorações especiais: O Azul de Toluidina, que foi utilizado em apenas um caso de tumor de mama de cadela e que permitiu concluir que não se tratava de mastocitoma, mas sim, infiltrado inflamatório (Figura 11) e o Tricrômico de Gomori, que auxiliou na confirmação das classificações dos subtipos tumorais analisados neste trabalho (Figura 12).

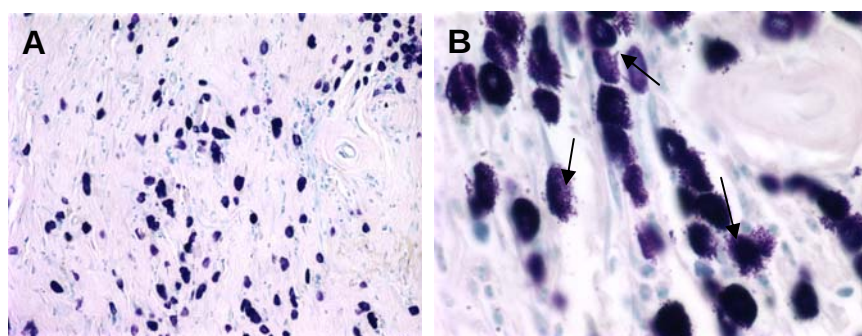


Figura 11 – Imagem microscópica de tumor de mama de cadela (Carcinosarcoma). Lâminas coradas com Azul de Toluidina, mostrando a metacromasia, ou seja, devido à presença de grânulos, os mastócitos coraram de roxo. (A) Aumento de 200x (no microscópio). (B) Aumento de 400X (no microscópio), permitindo a observação da granulação metacromática nos mastócitos (setas).

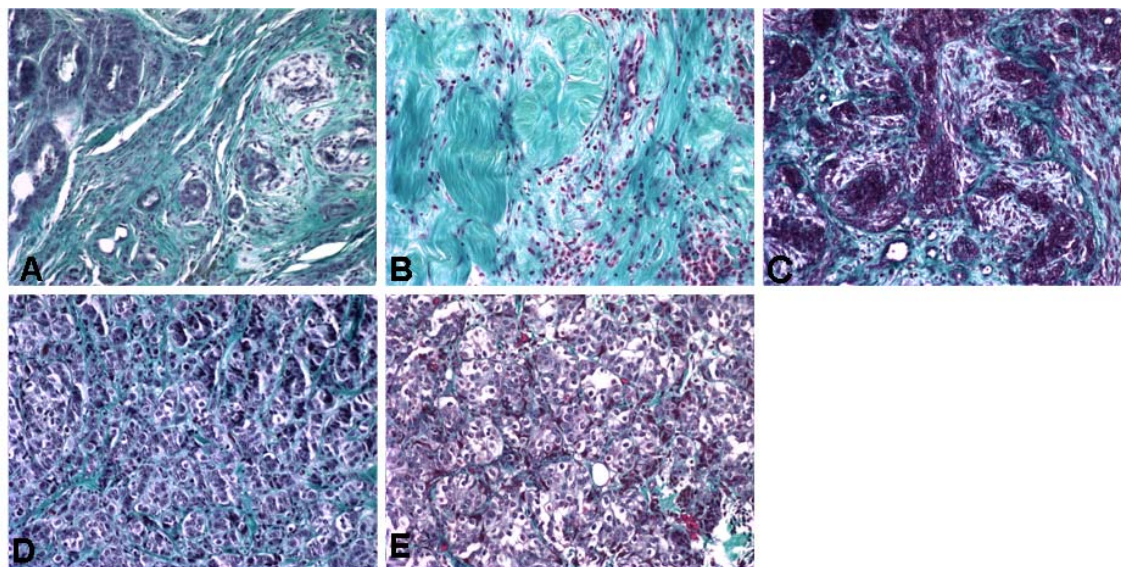


Figura 12 – Imagem microscópica de tumor de mama de cadelas (A, B, C) e de tumor de mama de mulheres (D e E). Na coloração verde, destaca-se o colágeno e, em roxo, células epiteliais. (A) Adenocarcinoma papilar; (B) Carcinossarcoma; (C) Adenocarcinoma tubular simples; (D) Adenocarcinoma tubular; (E) Adenocarcinoma tubular. Coloração com Tricrômico de Gomori; 200X (no microscópio).

4.2. Cultura de células

4.2.1. Cultura de células provenientes da mama normal de cadelas

Dos 20 explantes inseridos em cultura, apenas 30% aderiram ao substrato, proporcionando a adesão das células na superfície, o que ocorreu após dez dias de cultura (Figura 13 A).

Aparentemente dois tipos de grupos celulares foram observados. Um tipo, em menor quantidade, era composto por células pequenas que possuíam a morfologia arredondada e se dispunham bem próximas umas das outras, assemelhando-se às células epiteliais (Figura 13 B). O outro tipo, maior e mais numeroso, possuía a morfologia fibroblástico e suas células mantiveram-se mais separadas umas das outras, quando comparadas com as células epitelióides. A partir dessas observações e considerando a composição tecidual da estrutura da mama, pôde-se inferir que o primeiro tipo celular mencionado era composto de células epiteliais e o segundo, de células mesenquimais, especificamente fibroblastos

(Figura 13 B). No entanto, essas caracterizações só poderiam ser efetuadas e comprovadas com o uso de anticorpos monoclonais específicos (para ambos os tipos celulares). Esta comprovação não foi possível, uma vez que não havia número suficiente de células para os ensaios com imunomarcadores.

As células fibroblastóides apresentaram taxa de proliferação maior do que a apresentada pelas células epitelióides, fazendo-se necessária a sua retirada, pois ocupavam grande espaço no frasco e faziam desta área um recurso limitante para as células epitelióides (Figura 13 C).

Após 25 dias de cultura, foi realizada a tripsinização branda, com o propósito de retirar as células fibroblastóides da cultura. Com a remoção destas, as células epitelióides que permaneceram aderidas ao substrato da garrafa de cultura, mantiveram-se viáveis, mas com crescimento lento (Figura D). Após 60 dias de cultivo as células epitelióides apresentaram sinais morfológicos de degeneração, como contração da membrana celular, presença de vacúolos citoplasmáticos (Figura 13 E) e citoplasma com aspecto granuloso, terminando o processo em lise celular.

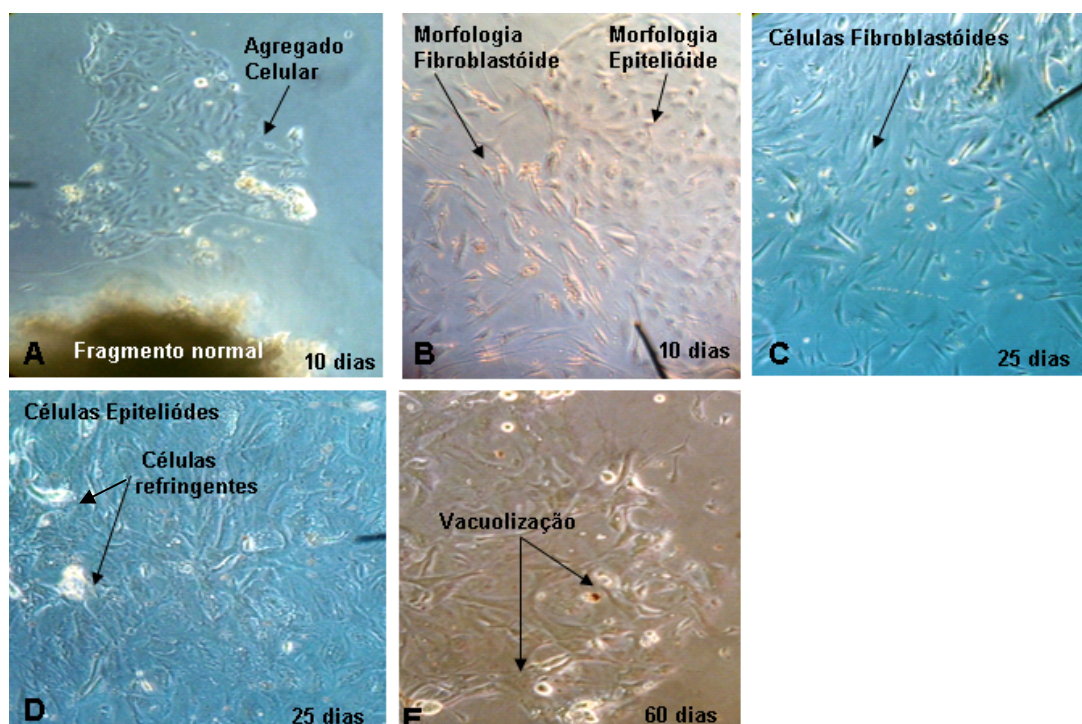


Figura 13 – Imagem de cultura de células provenientes da mama normal de cadelas, observadas em microscópio de luz invertida. (A) Células aderidas ao substrato da garrafa, formando agregado celular. É possível observar também o fragmento normal de onde as células se originaram; (B) Células com morfologia fibroblastóide e células em morfologia epitelióide; (C e D) proliferação celular. Podem-se observar células refringentes que indicam divisão celular ativa; (E) Sinais de degeneração que podem ser evidenciados por vacuolização citoplasmática. Aumento de 200x (no microscópio).

4.2.2. Cultura de células provenientes de tumores malignos da mama de cadelas

Dos 20 explantes inseridos na garrafa de cultura, 70% mantiveram-se aderidos ao substrato, proporcionando a migração e a adesão das células para o substrato (Figura 14 A e B), o que ocorreu em cinco dias após o início da cultura.

As células mantiveram alta taxa de multiplicação e possuíam muitos vacúolos citoplasmáticos, pleomorfismo celular e nucléolo central evidente. Foram observados grupos de células próximas umas das outras, com morfologia epitelióide (Figura 14 C), que pareciam ser células epiteliais. Também foram observadas outras células que se mantinham mais separadas umas das outras com morfologia mais alongada, sendo, por estas características fibroblastóides, classificados como fibroblastos (Figura 14 C).

Quando a cultura atingiu a semiconfluência, após 20 dias de cultivo, foi realizada uma tripsinização branda, que possibilitou a retirada das células fibroblastóides. As células epitelióides permaneceram no frasco de cultura após a tripsinização branda e se mantiveram viáveis, mas após 50 dias começaram a apresentar sinais morfológicos de degeneração, como contração da membrana celular e vacúolos citoplasmáticos, terminando o processo em lise celular (figura 14 E e F).

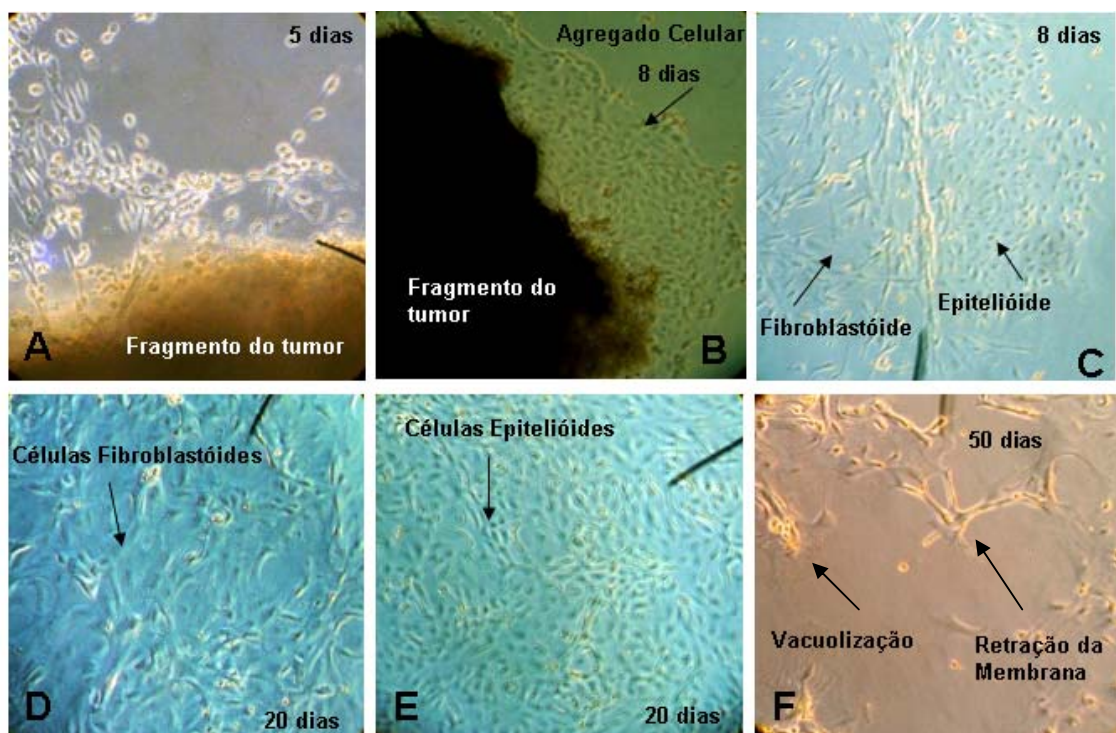


Figura 14 – Imagem de cultura de células provenientes de tumor de mama em cadelas, observadas em microscópio de luz invertida. (A) Células migrando do fragmento; (B) Células aderidas ao substrato, constituindo um grande agregado com característica epitelióide; (C) Células com formato fibroblastóide e células com formato epitelióide; (D e E) intensa proliferação celular; (F) Sinais de degeneração que podem ser evidenciados por retração da membrana celular e vacuolização citoplasmática. Aumento de 200x (no microscópio).

4.2.3. Cultura de células provenientes da mama normal de mulheres

Em média, 60% dos 20 explantes inseridos no frasco de cultura aderiram à superfície e proporcionaram a migração das células, o que ocorreu após 12 dias de cultura (Figura 15 A e B).

Aparentemente havia dois tipos celulares: um composto por células com morfologia epitelióide e o outro, composto por células com morfologia fibroblastóide. Pelo fato de a mama ser constituída de parênquima composto de células epiteliais e o estroma, composto de células mesenquimais, é provável que estas células fossem epiteliais e mesenquimais, especificamente fibroblastos (Figura 15 C e D).

As células com a morfologia epitelióide, eram viáveis, apresentavam baixa taxa de proliferação, quando comparadas às células com a morfologia fibroblastóide.

Com 20 dias de cultura as células fibroblastóides haviam ocupado grande parte da garrafa de cultura. Por essa razão e com a finalidade de separar as células epitelióides das fibroblastóides, foi realizada uma tripsinização branda e, após esse procedimento, as epitelióides mantiveram-se aderidas à superfície do frasco inicial, sendo então retirada a maior parte das fibroblastóides. As células epitelióides que permaneceram aderidas ao substrato da garrafa mantiveram-se com baixa proliferação e começaram a se soltar do substrato (Figura 15 E). Com o propósito de separar as células e na tentativa delas se distribuírem melhor na área do frasco, foi realizada outra tripsinização, mas as células não aderiram novamente ao substrato da garrafa, ocorrendo então a lise. Esta cultura manteve-se por 60 dias.

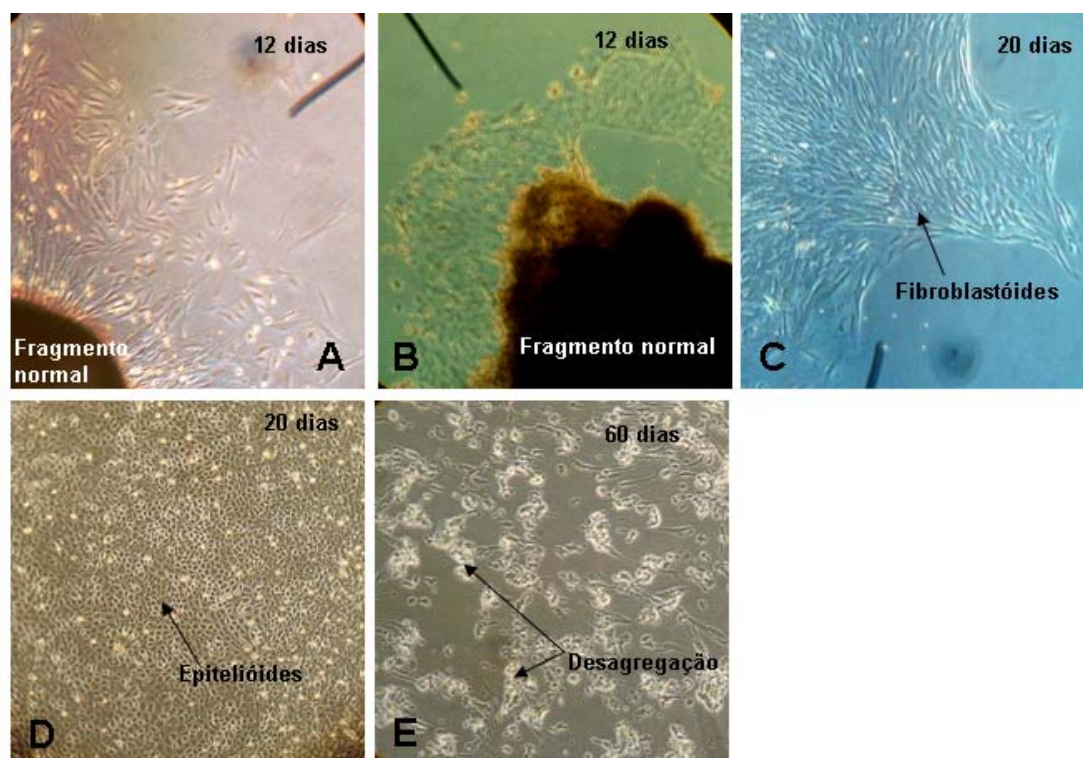


Figura 15 – Imagem de cultura de células provenientes da mama normal de mulheres, observadas em microscópio de luz invertida. (A e B) Células aderidas ao substrato da garrafa; (C e D) Células com morfologia fibroblastóide e células com morfologia epitelióide, respectivamente; mostrando a proliferação celular de ambos os tipos celulares; (E) Observar que as células estão desagregando do substrato com destruição celular, representada por fragmentação das células. Aumento de 200x (no microscópio).

4.2.4. Cultura de células provenientes de tumores malignos da mama de mulheres

Cerca de 50% dos 20 explantes colocados no frasco de cultura mantiveram-se aderidos ao substrato, proporcionando assim a migração das células para o substrato, o que ocorreu após sete dias (Figura A).

Essas células mantiveram alta taxa de multiplicação e, dentro de dez dias, já havia grupos de células próximas aos explantes (Figura 16 B e C). Foram observados grupos de células bem próximas umas das outras, com a morfologia epitelióide, que pareciam ser células epiteliais (Figura 16 C). Também foram observadas outras células que se mantinham mais separadas umas das outras, com morfologia mais alongada e de formato fibroblastóide. Portanto, acredita-se que eram fibroblastos (Figura 16 B).

Após 30 dias de cultura, devido à alta proliferação das células fibroblastóides e, conseqüentemente, ao grande número dessas células, foi realizada a tripsinização branda, a fim de manter apenas as células epitelióides. Sendo assim, as células epitelióides permaneceram aderidas ao substrato da garrafa de cultura inicial (Figura D e E).

As células epitelióides permaneceram viáveis em cultura, mas com uma taxa de proliferação baixa.

Esta cultura manteve-se durante 80 dias, quando as células epitelióides começaram a apresentar sinais morfológicos de degeneração, como retração da membrana celular e muitos vacúolos citoplasmáticos, terminando o processo em lise (figura 16 F).

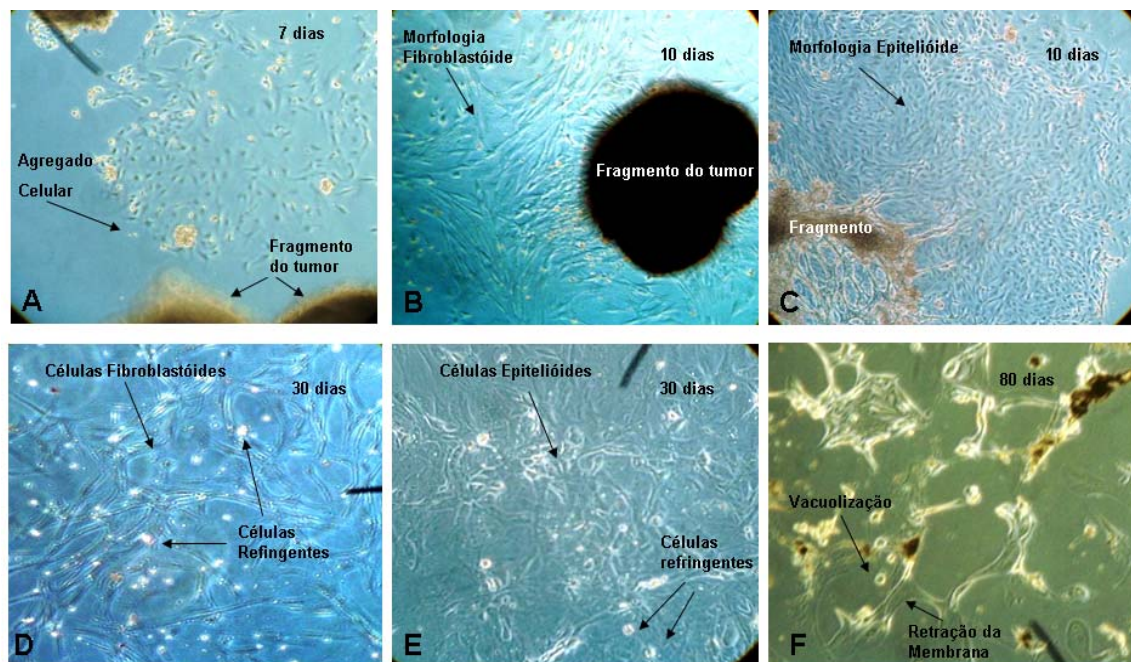


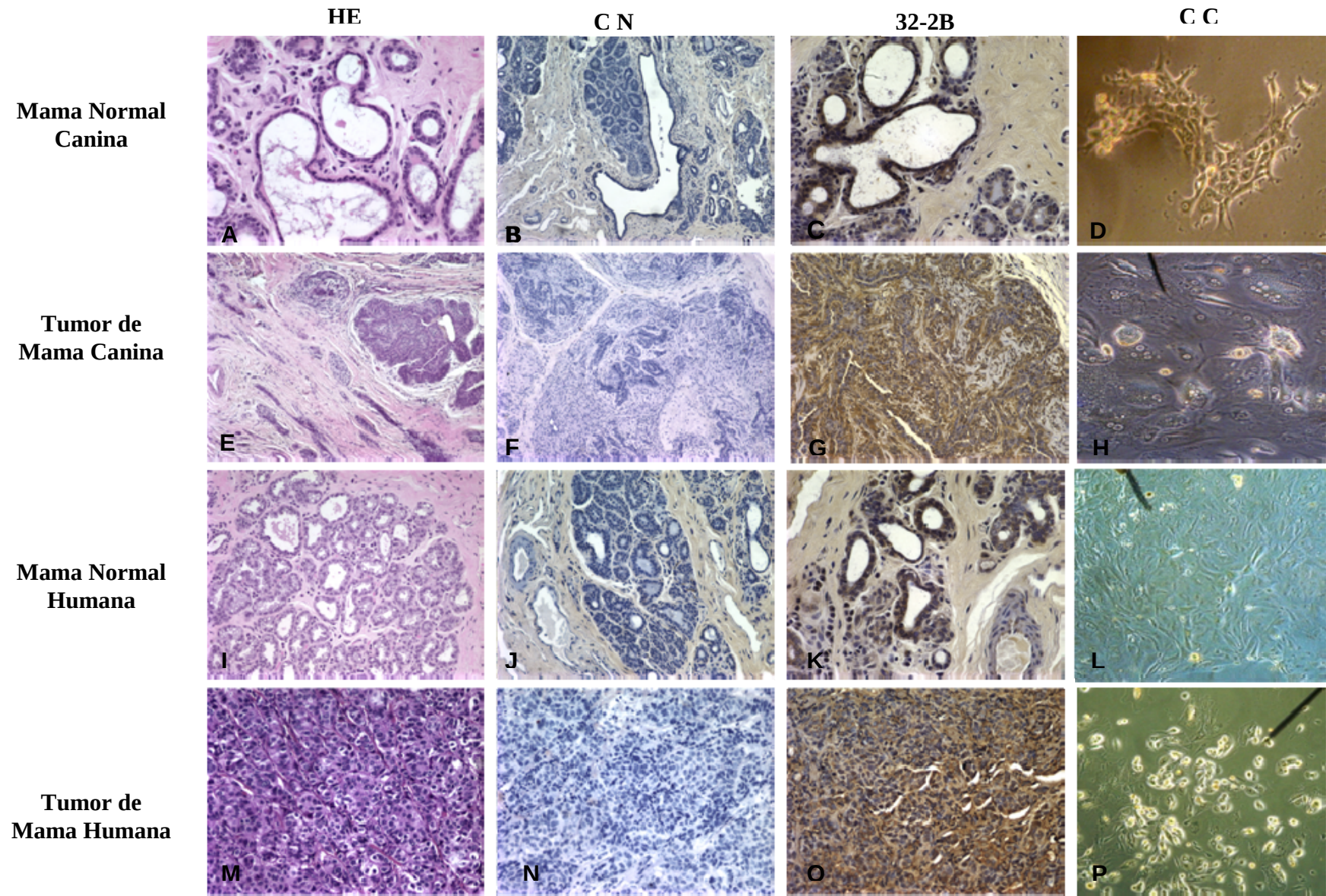
Figura 16 – Imagem de cultura de células provenientes de tumores malignos de mama, em mulheres, observadas em microscópio de luz invertida. (A) grupo de células aderidas ao substrato da garrafa; (B e C) células com morfologia fibroblastóide e epitelióide, respectivamente; (D e E) Proliferação celular, mostrando células refringentes que indica divisão celular ativa; (F) sinais de degeneração que podem ser evidenciados pela mudança da morfologia, tais como: retração da membrana e vacuolização. Aumento de 200x (no microscópio).

4.3. Avaliação Imuno-Histológica

Os ensaios imuno-histoquímicos em tecidos de mama normal da espécie canina (cadela) demonstraram a presença dos desmossomas (que se localizam nos limites intercelulares) por meio da imunomarcção com o anticorpo anti-desmogleína-1. Os desmossomas apareceram marcados com intensa coloração marrom escura, localizada na superfície lateral (periferia celular) das células que formavam os túbulos e os alvéolos (Figura 17 C) que constituem o parênquima da mama da espécie canina (cadela). Esta coloração encontrava-se tão homogênea que, por vezes, dificultava a observação dos limites celulares, dando uma falsa impressão de que os desmossomas estavam localizados em todas as regiões celulares, quando na verdade se encontravam na região de contato, entre as células.

De modo semelhante à mama normal da espécie canina, os tecidos da espécie humana (mulheres) apresentaram as mesmas características mencionadas, ou seja, coloração intensa, marrom escura, nas periferias das células que formavam o parênquima da mama (Figura 17 K). Essa coloração também se encontrava de forma tão intensa que dificultava a visualização nos limites celulares.

Ao contrário das células normais, as células cancerosas da mama canina apresentaram mudança no padrão de coloração, que se tornou mais clara e difusa nos citoplasmas das células correspondentes ao parênquima da glândula mamária (figura 17 G). Assim também ocorreu com as células cancerosas da mama humana, que demonstraram a mesma mudança no padrão de coloração e que passou a ser difusa e citoplasmática (Figura 17 O).



43 **Figura 17** – Imagem da mama normal e tumoral provenientes das espécies humana e canina. Coloração com HE (A, E, I e M); Reação imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal 32-2B (anti-desmogleína -1): Controle negativo – CN (B, E, J e N) e marcação com o anticorpo 32-2B (C, G, K e O); Cultura de células (D, H, I e P). (G e O) mostram coloração predominantemente citoplasmática (coloração difusa). (C e K) mostram intensa coloração nas estruturas da glândula mamária de ambas as espécies. Aumento de 200 x (nos microscópios de luz e de luz invertida).

V. DISCUSSÃO

5.1. Cultura de células

Linhagens de células cancerosas da mama têm sido usadas como modelo para estudo do câncer de mama (VARGO-GOGOLA *et al.*, 2007). Um dos objetivos deste trabalho foi tentar estabelecer linhagens de células epiteliais provenientes da glândula mamária das espécies humana e canina, para que novos estudos pudessem ser desenvolvidos, utilizando-as como instrumento para pesquisa. Desde o estabelecimento da primeira linhagem de células de carcinoma de mama, por Lasfagues e Ozzello (1958), poucas foram as linhagens estabelecidas com sucesso (PEIXOTO, 2001).

Durante a realização deste trabalho foi possível o cultivo de células normais e cancerosas de ambas as espécies, as quais se mantiveram em cultura por aproximadamente três meses. Os grupos de células epitelióides que aderiram às garrafas possuíam dependência das células estromais, pois à medida que se retiravam as células fibroblastóides, cessava o crescimento das células epitelióides. Segundo Bhowmick *et al.* (2004), a interação das células do estroma é importante para a progressão e o desenvolvimento das células epiteliais. Esta interação é mediada por sinais de componentes da matriz extracelular, que induzem a proliferação destas células. Apesar da dependência das células epiteliais para com as células mesenquimais, a alta taxa proliferativa das células fibroblastóides impedia, após certo tempo, o desenvolvimento daquelas, prejudicando sua expansão. Tendo em vista que o objetivo do trabalho era estabelecer uma linhagem de células epiteliais, foi necessário, então, retirar da cultura as células com morfologia fibroblastóide. De acordo com Lasfargues e Ozzello (1958), os componentes do estroma tecidual da mama se opõem à migração das células epiteliais em cultura, formando uma barreira e impedindo seu livre desenvolvimento. Para proporcionar um melhor ambiente para as células epitelióide era utilizado meio de cultura condicionado pelas células fibroblastóides, mas mesmo assim, as células epitelióides mantiveram viáveis por aproximadamente três meses de cultura e então cessaram a multiplicação ocorrendo a lise das mesmas.

Observou-se a baixa atividade de proliferação das células normais, quando comparadas com as células cancerosas de ambas as espécies. De acordo com McDonald (1996), a baixa atividade proliferativa das células derivadas do parênquima da mama normal ocorre por causa das diversas propriedades das células normais, como a dependência de ancoragem, a inibição de crescimento densidade-dependente, a grande dependência de soro, o fator de crescimento e a extensão de vida finita. Dessa forma, o cultivo das células normais tornou-se ainda mais difícil do que o cultivo das células cancerosas, pois as células cancerosas possuíam intensa atividade celular, mutações genéticas ou epigenéticas, relacionadas com a proliferação e a diferenciação celular (VARGO-GOGOLA *et al.*, 2007).

A instabilidade das células presentes na cultura primária, constitui uma limitação para o estabelecimento de linhagens celulares estáveis (imortalizadas). Embora existam dificuldades para a obtenção de novas linhagens celulares estáveis, este estudo de células provenientes de tecidos originados da glândula mamária constituiu um passo inicial e de muita importância para o estabelecimento de novas linhagens celulares estáveis. Tais dificuldades deverão ser superadas e novos resultados a partir deste, poderão aprimorar as técnicas utilizadas, resultando assim em melhores diagnósticos e tratamento para o câncer de mama.

5.2. Imuno-Histoquímica

Em condições patológicas como no câncer, a estabilidade desmossômica pode estar alterada (DUSEK *et al.*, 2007; CHIDGEY e DAWSON, 2007; OLIVEIRA, 2008). Este estudo constatou a presença dos desmossomas por meio da interação do anticorpo 32-2B com a desmogleína-1, que pôde ser visualizada pela intensa coloração na membrana celular das células epiteliais, correspondentes aos ductos e ácinos, originários da mama normal das espécies humana e canina. A intensidade da coloração sugeriu a semelhança nos níveis de expressão da desmogleína-1, nos desmossomas de ambas as espécies. Como a embriologia, a anatomia e a morfologia da mama das cadelas se assemelham às da mama humana, tal semelhança no padrão de coloração para a análise dos desmossomas foi justificada e estava de acordo com Vilela (1989), quando desenvolveu o anticorpo 32-2B e o testou em tecidos normais da mama humana. Desta forma, foi possível observar a

marcação dos grupos de desmossomas nos limites das células que constituem os ductos e ácinos da glândula mamária, além de outros tecidos, como da glândula salivar submandibular, ureter, estômago, entre outros.

Comparando os resultados obtidos por meio da coloração das células normais das espécies humana e canina, foi possível analisar a redução no padrão de coloração de células cancerosas de ambas as espécies. Este resultado demonstrou que as estruturas relacionadas com a adesão celular (neste caso, os desmossomas) poderiam estar alteradas. Segundo Yaldizl *et al.* (2005), as células transformadas, que dão origem aos tumores epiteliais como os carcinomas, apresentam baixa adesividade com outras células e com a matriz extracelular. Para Gonzalez *et al.* (1997), os principais mecanismos envolvidos são: modificações e irregularidades na membrana plasmática, redução de moléculas de adesão, dentre as quais se destacam as caderinas, e diminuição dos íons de cálcio nas células, proporcionando a internalização dos desmossomas.

As células cancerosas de ambas as espécies demonstraram também uma coloração difusa e citoplasmática. Segundo Dusek *et al.* (2007), esta coloração citoplasmática podia ser uma resposta às condições de baixa concentração de cálcio que desestabilizaram os desmossomas e resultaram na sua internalização. Para Roa Estério *et al.* (2001), tumores agressivos localizados e lesões metastáticas apresentam diminuição ou ausência na expressão das caderinas. Esta perda de expressão das caderinas pode estar associada fortemente com a hipermetilação dos sítios, no início da transcrição deste gene, assim como mutações epigenéticas observadas em alguns carcinomas de mama, descritos por Takeichi *et al.* (1995). A diminuição da interação das caderinas com outras estruturas de adesão celular permitiu às células cancerosas se deslocarem com facilidade e se infiltrarem nos tecidos vizinhos, promovendo assim sua disseminação.

Em alguns tumores malignos tem-se demonstrado que a expressão dessas moléculas de adesão está relacionada com o prognóstico e com a sua capacidade de gerar metástases. A baixa expressão das caderinas em carcinomas da mama tem sido indicativo de baixa sobrevida das pacientes (ROA ESTERIO *et al.*, 2001; BREMNES *et al.*, 2002).

No caso das células cancerosas da glândula mamária, das espécies humana e canina, o nível reduzido de desmogleína pode estar relacionado com a diminuição da adesividade,

o que se torna vantajoso para as células tumorais, uma vez que a capacidade de invadir tecidos é favorecida por esta nova característica.

A partir do analisado neste trabalho, tem-se que o anticorpo monoclonal (32-2B) pode ser uma ferramenta eficiente em estudos que venham a ter o câncer de mama como alvo.

VI. CONCLUSÕES

Após o estudo histológico, imuno-histoquímico e de cultura de células de tecidos normais e cancerosos da mama humana e canina, pode-se então concluir que:

- as células da glândula mamária normal de cadelas possuem semelhanças com as células da glândula mamária normal de mulheres quanto aos aspectos histológicos e morfológicos;
- os tumores provenientes da mama humana (mulheres) e canina (cadela) foram diagnosticados e classificados de acordo com a Organização Mundial da Saúde;
- os resultados obtidos por meio da análise imuno-histoquímica das células normais das espécies humana e canina, apresentaram mudanças no padrão de coloração em células cancerosas de ambas as espécies, quando comparadas com a coloração obtida para as células normais. Por esta razão, acredita-se que as estruturas relacionadas com a adesão celular (neste caso, os desmossomas) podem estar alteradas;
- a metodologia para a histologia e imuno-histoquímica mostrou-se adequada para avaliação de semelhanças ou dissimilaridades entre as espécies estudadas;
- *in vitro* as células da glândula mamária normal de cadelas demonstraram semelhanças com as células da glândula mamária normal de mulheres nos aspectos histológicos e morfológicos, assim como as cancerosas;
- *in vitro*, houve baixa atividade de proliferação das células normais das espécies humana e canina, quando comparadas com as cancerosas de ambas as espécies;
- os grupos de células epiteliais mantidos em cultura demonstraram dependência das estromais pois, à medida que as células fibroblastóides eram retiradas, as células epitelióides cessavam o seu crescimento;
- a metodologia utilizada para a cultura de células foi adequada para os aspectos rotineiros, porém não permitiu o estabelecimento de uma linhagem celular estável (imortalizada).

VII. PERSPECTIVAS

O desafio de estabelecer linhagens celulares estáveis derivadas de tecidos da glândula mamária normal e cancerosa deverá continuar, uma vez que este objetivo não foi alcançado no presente trabalho. Acredita-se que para ocorrer o sucesso do estabelecimento das linhagens de células epiteliais da mama, tanto de mulheres quanto de cadelas, será necessário utilizar substratos mais adequados, semelhantes à matriz extracelular. Os frascos utilizados para a realização deste trabalho eram de cultura com superfícies não forradas por substâncias que constituem a matriz extracelular, como o colágeno e/ou laminina. Além disso, novas estratégias deverão ser realizadas com o uso de hormônios e de fatores de crescimento adicionais àqueles utilizados, a fim de proporcionar, para as células em cultura, maior semelhança com o ambiente *in vivo*.

Acredita-se que será necessário estabelecer convênios com instituições de grandes cidades, pois proporcionará a obtenção de maior número de casos para serem estudados. Com o número maior de casos e de coletas, será possível comparar a expressão da desmogleína-1 em subtipos diferentes de carcinomas e, principalmente, em tumores menos diferenciados.

XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Junções celulares. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, Cap.19, p.1066-1126, 2004.

BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and Praticce of Histological Techniques**. 4.ed. New York: Churchill Livingstone, 766p., 1996.

BERRY, J.D. Rational monoclonal antibody development to emerging pathogens, biothreat agents and agents of foreign animal disease: The antigen scale. **The Veterinary Journal**, v.170, n.2, p.193-211, 2005.

BHOWMICK, N.A; NEILSON, E.G.; MOSES, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. **Nature**, v.432, n.7015, p.332-337, 2004.

BRASILEIRO FILHO, G. Mama. **Bogliolo Patologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.19, p.613-643, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. Métodos de ensino em patologia. **Bogliolo Patologia Geral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.2, p.9-12, 2004.

BURNET, F.M. A modification of jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. **Australian Journal of Science**, v.20, p.67-69, 1957.

BREMNES, R.M.; VERE, R.; HIRSCH, F.R.; FRANKLIN, W.A. the e-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis and prognosis. **International Journal for Lung Cancer and other Thoracic Malignancies**, v.36, n.2, p.115-124, 2002.

CALICH, V.; VAZ, C. Imunoglobulinas. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, Cap.4, p.55-82, 2001.

CAMPBELL, A. M. **Monoclonal Antibody and Immunosensor Technology**. Amsterdam: Elsevier, Cap.4, p.51-115, 1991.

CASSALI, G. D. **Estudos morfológicos, imuno-histoquímicos e citométricos de tumores mamários da cadela- aspectos comparativos com neoplasias da mama humana**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Patologia, Escola de Veterinária, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 73p., 2000.

CASSALI, G.D. Patologias da glândula mamária. In: NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.119-133, 2002.

CHIDGEY, M.; DAWSON, C. Desmosomes: a role in cancer? **British Journal of Cancer**, v.96, n.12, p.1783-1787, 2007.

CHIDGEY, M. Desmosomes and disease: an update. **Histology and histopathology**, v.17, n.4, p.1179-1192, 2002.

COWIN, P.; GARROD, D.R. Antibodies to epithelial desmosomes show wide tissue and species cross-reactivity. **Nature**, v.302, n.5904, p.148-150, 1983.

CONN, I.G.; VILELA, M.J.; GARROD, D.V.; CROKER, J.; WALLACE, D.M.A. Immunohistochemical staining with monoclonal antibody 32-2B to desmosomal glycoprotein 1. **British Journal of Urology**, v.65, n.2, p.176-180, 1990.

COSTA, S. D.; LANGE, S.; KLINGA, K.; MERKLE, E.; KAUFMANN, M. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer: results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. **Europe Journal of Cancer**, v.38, n.10, p.1329-1334, 2002.

DALECK, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.; ALESSI, A.C.; SANTANA, A.E.; MARTINS, M.I.M. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural**, v.28, n.1, p.95-100, 1998.

DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. Mama. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.18, p.378-379, 1982.

DONNAY,I.; RAUIS, J.; DEVLEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.56, n.9, p.1188-1194, 1995.

DUSEK, R.L.; GODSEL, L.M.; GREEN, K.J. Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. **Journal of Dermatological Science**, v.45, n.1, p.7-21, 2007.

DYCE, M.K.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Glândula mamária. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap.10, p.357-358, 2004.

FAUSTINO, A.M.R.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J.A.; NEDERBRACKT, H. Tenascin expression in normal, hyperplastic, dysplastic and neoplastic canine mammary tissue. **Journal of Comparative Pathology**, v.126, n.1, p.1-8, 2002.

FRANDSON, R. D. Anatomia das glândulas mamárias. In: FRANDSON, R. D. **Anatomia e Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, p.366-373, 1979.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells**: manual of basic techniques. 4.ed. New York: Wiley-Liss, p.577, 2000.

GAMA, A.; ALVES, A.; SCHMITT, F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. **Virchows Archiv**, v.453, n.2, p.123-132, 2008.

GARROD, D; CHIDGEY, M. Desmosome structure, composition and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1778, n.3, p.572-587, 2007.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap.17 , p.493-494, 2007.

GERALDES, M.; GARTNER, F.; SCHMITT, F.N. Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. **The Veterinary Record**, v.146, n.14, p.1140-1148, 2000.

GODING, J.W. **Monoclonal Antibodies**: principles and practice. 2.ed. San Diego: Academic, Cap.1, p.5-20, 1986.

GONZALEZ, J.S.L.; LOPEZ, M.I.V.; TORRES, A.P.; GARCIA, A.H. Expresión de la molécula e-caderin e líneas celulares de carcinomas de pulmón. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v.10, p.7-12, 1997.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendência e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.3, p.227-234, 2005.

HARADA, H.; IWATSUKI, K.; OHTSUKA, M.; HAN, G.W.; KANEKO, F. Abnormal desmoglein expression by squamous cell carcinoma cells. **Acta Dermato-Venereologica**, v.6, n.6, p.417-420, 1996.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **American Journal Clinical Pathology**, v.76, n.6, p.816-821, 1981.

IMAI, K.; KUMAGAI, S.; NAKAGAWA, K.; YAMAMOTO, E.; NAKANISHI, I.; OKADA, Y. Immunolocalization of desmoglein and intermediate filaments in human oral squamous cell carcinomas. **Head & Neck**, v.17, n.3, p.204-212, 1995.

ISHII, N.; ISHIDA-YAMAMOTO, A.; HASHIMOTO, T. Immunolocalization of target autoantigens in IgA pemphigus. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.29, n.1, p.62-66, 2004.

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. Glândula mamária. **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.22, p.449-452, 2004a.

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Histologia e seus métodos de estudo. **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.1, p.15-21, 2004b.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, n.5517, p.495-497, 1975.

KOLB, E. Fisiologia da glândula mamária. **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.21, p.413-414, 1987.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Mama feminina. In: ROBBINS; S; COTRAN, R. **Bases Patológicas das Doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap.23, p.1170-1202, 2005.

KRUNIC, A.L.J.; GARROD, D.R.; MADANI, S.; BUCHANAN, M.D.; CLARK, R.E. Immunohistochemical staining for desmoglein 1 and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. **British Journal of Cancer**, v.77, n.8, p.1275-1279, 1998.

LASFARGUES, E.Y.; OZZELLO, L. Cultivation of human breast carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v.21, n.6, p.1131-1147, 1958.

LEWIN, B. Oncogenes and Cancer. **Genes VI**. New York: Oxford University, p.1131-1172, 1996.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P.; TAFURI, W.L. Mama. **Bogliolo Patologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.19, p.479-488, 1987.

LOPES, A., IYEYASU, H., LOPEZ, L.F, CASTRO, R.M., ALMEIDA, E.S. **Oncologia para graduação**. 1.ed. São Paulo: Tecmed, p.515-520, 2005.

MARTINS, D.C.; FERREIRA A.M.R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentado múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p.189-191, 2003.

MARTINS, P.M.; COTARD, M.; MEALOT, J.P.; ANDRE, F.; RAYNAUD, J.P. Animal model for hormone-dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profile in canine and feline mammary tumors and survival rate. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.12, n.1, p.13-17, 1984.

MATTEY, D.L; GARROD, D.R. Splitting and internalization of the desmosomes of cultured kidney epithelial cells by reduction in calcium concentration. **Journal of Cell Science**, v.85, n.1, p.113-124, 1986.

MCATTER, J.A; DAVIS, J. Basic cell culture technique and maintenance of cell lines. In: DAVIS, J. M. **Basic Cell Culture: A Practical Approach**. New York: Oxford University, p.93-148, 1996.

MILES, D.W. Update on HER-2 as target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. **Breast Cancer Research**, v.3, n.6, p.380-384, 2001.

MCDONALD, C. Primary culture and establishment of cell line. In: DAVIS, J.M. **Basic Cell Culture: A Practical Approach**. New York: Oxford University, p.149-180, 1996.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Ames, USA: Iowa State, p.509-546, 2002.

MEISNER, A.L.; HOUMAN FEKRAZAD, M.; ROYCE, M.E. Breast disease: benign and malignant. **The Medical Clinics of North America**, v.92, n.5, p.1115-1141, 2008.

MISDORP, W. Tumors of mammary gland. In: MEUTEN, D.J. (Ed). **Tumors in Domestic Dogs**. Ames, USA: Iowa State, p.575-606, 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R. W; HELLMEN, E.; LIMPISCOMB, T. P. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. Geneva: World Health Organization, v. 2, 1999.

MORRISSON, W. B. (Ed). Canine and feline mammary tumors. **Cancer in Dogs and Cats: medical and surgical management**. Baltimore: Williams & Wilkins, p.591-598, 1998.

MOTTOLESE, M.; MORELLI, L.; AGRIMI, U.; BENEVOLO, M.; SCIARRETA, F.; ANTONUCCI, G.; NATALI, P. G. Spontaneous canine mammary tumors. **Laboratory Investigation**, v.71, n.2, p.182-187, 1994.

MOULTON, J.E.; TAYLOR, D.O.N.; DORN, C.R.; ANDERSEN, A.C. Canine mammary tumors. **Pathology Veterinary**, v.7, n.4, p. 289-320, 1970.

MOULTON, J.E. **Tumors of the mammary glands**. 3.ed. Berkeley: University of California press, Berkeley, Cap.12, p.518-552, 1990.

NATSUGOE, S.; AIKOU, T.; SHIMADA, M.; KUMANOHOSE, T.; TEZUKA, Y.; SAGADA, M.; YOSHINAKA, H.; BABA, M.; FUKUMOTO, T. Expression of desmoglein in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Journal of Surgical Oncology**, v.57, n.2, p.105-110, 1994.

- NETTER, F.H. Glândula mamária. **Atlas de Anatomia Humana**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 590p., 2004.
- O'KEEFE, D.A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, p.2344-2354, 1997.
- OLIVEIRA, L. O; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, n.2, p.105-110, 2003.
- OLIVEIRA, R.R. **Internalização de desmossomas em células normais e cancerosas da mama humana e o papel da proteína quinase C**. Monografia - Departamento de Bioquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 15p., 2008.
- PEIXOTO, E.B.M.I. **Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares de tumores primário da mama**. Monografia. Departamento de Biologia Animal. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 43p., 2001.
- PELETEIRO, M.C. Tumores mamários na cadela e na gata. Lisboa: **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.89, n.509, p.10-29, 1994.
- PULLAN, S.E.; STREULI, G. H. The mammary gland epithelial cell. In: PULLAN, S. E.; STREULI, G. H.; HARRIS, A. (Ed). **Epithelial Cell Culture**. Cambridge: Cambridge University, Cap.3, p.97-121, 1992.
- REA, M.A. Os benefícios da amamentação para a saúde da mulher. Rio de Janeiro: **Jornal de Pediatria**, v.80, n.5, p.142-146, 2004.
- ROA ESTERIO, I.; VILLASECA, M.A.; ARAYA ORÓSTICA, J.C.; ROA, J.C.; ARETXABALA URQUIZAR, X.; MIRANDA, M. Moléculas de adhesión celular y cáncer. **Revista Chilena de Cirugía**, v.53, n.5, p.504-510, 2001.
- ROSEN, P.P.; OBERMAN, H.A. **Tumors of the mammary gland**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 390p., 1993.

- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E. Structure and function of the skin. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6.ed. Philadelphia: WB Saunders Co, Cap.1, p. 1-70, 2001.
- STRANDBERG, J.D.; GOODMAM, D.G. Breast cancer. Animal model: Canine mammary neoplasia. **The American Journal of Pathology**, v.75, n.1, p.225-228, 1974.
- STEEVES, E.B.; CHELACK, B.J.; CLARK, E.G.; HAINES, D.M. Altered immunohistochemical staining for desmoglein in skin biopsies in canine pemphigus foliaceus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.53-56, 2002.
- SUTER, M.M.; CRAMERI, F.M.; OLIVRY, T.; MUELLER, E.; VON TSCHARNER, C.; JENSEN, P.J. Keratinocyte biology and pathology. **Veterinary Dermatology**, v.8, n.2, p.67-100, 1997.
- SZABÓ, C.I.; WAGNER, L.A.; FRANCISCO, L.V.; ROACH, J.C.; ARGONZA R.; KING, M.C.; OSTRANDER, E.A. Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence among species. **Human Molecular Genetics**, v.5, n.9, p.1289-1298, 1996.
- TAFURI, C. P. Patologia geral da mama. **Patologia Ginecológica e Obstétrica**. Rio de Janeiro: Médica e Científica, p.179-231, 1989.
- TAKEICHI, M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.5, n.5, p.806-811, 1993.
- TAVASSOLI, A.F.; DEVILEE P. **World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. Lyon: IARC, 432 p., 2003.
- TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, A.O.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. 2.ed. São Paulo: Manole, Cap.2, p.37-50, 2003.
- VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n.9, p.659-672, 2007.

VILELA, M.J.; PARRISH, E.P.; WRIGHT, D.H.; GARROD, D.R. Monoclonal antibody to desmosomal glycoprotein-1. A new epithelial marker for diagnostic pathology. **The Journal of Pathology**, v.153, n.4, p.365-375, 1987.

VILELA, M.J. **Monoclonal Antibodies against Desmosomal Glycoprotein I, Desmoglein**. Ph.D Thesis, Southampton University, UK. 1989.

VILELA, M.J.; HASHIMOTO, T.; NISHIKAWA, T.; NORTH, A.J.; GARROD, D.A. A simple epithelial cell line (MDCK) shows heterogeneity of desmoglein isoforms, one resembling pemphigus vulgaris antigen. **Journal of Cell Science**, v.108, n.4, p.1743-1750, 1995.

VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; BRAGA, J.L. Câncer: biologia, fractais e inteligência artificial. **Ciência Hoje**, v.24, n.141, p.16-25, 1998.

VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; RENATO, N.S.; CAZARES, L.; LATTANZIO, F.; WARD, M.; SEMMES, O. J. Proteomic and fractal analysis of a phenotypic transition in the growth of human breast cells in culture. **Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment**, v.12, 12006p., 2007.

WASCHKE, JENS. The desmosome and pemphigus. **Histochemistry Cell Biology**, v.130, n.1, p.21-54, 2008.

YALDIZL, M.; HAKVERDI, A.U.; BAYHAN, G.; AKKUS, Z. Expression of e-cadherin in squamous cell carcinomas of the cervix with correlations to clinicopathological features. **European Journal Gynaecological Oncology**, v.26, n.1, p.95-98, 2005.

YANCEY, K.B. The pathophysiology of autoimmune blistering diseases. Milwaukee: **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.4, p.825-828, 2005.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Correlação entre biópsia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.1-8, 2001.

IX. ANEXOS

9.1. Protocolos

Inclusão em parafina

Após a coleta do material, no centro cirúrgico, os fragmentos normais e cancerosos da mama, das espécies humanas e caninas, foram acondicionados em frascos que continham formol 10%, tamponado, e foram transportados para o Laboratório de Histologia. Este material ficou, no período de 12 a 24 horas, nesta solução, pois é o tempo ideal para a fixação (TOLOSA *et al.*, 2003).

Após a fixação, esses fragmentos passaram pelos processos de hidratação.

- Álcool 70%, por 45 minutos
- Álcool 80%, por 45 minutos
- Álcool 90%, por 45 minutos
- Álcool 95%, por 45 minutos
- Álcool absoluto I, por 45 minutos
- Álcool absoluto II, por 45 minutos
- Álcool absoluto II, por 45 minutos
- Álcool 50%, Xilol 50%, por 45 minutos
- Xilol I, por 45 minutos
- Xilol II, por 45 minutos
- Xilol III, por 45 minutos

Após o processo de hidratação, os materiais foram incluídos em parafina

- Uma hora, em parafina I
- Uma hora, em parafina II
- Uma hora, em parafina III

Coloração Hematoxilina e Eosina

As lâminas com os cortes passaram pelo processo de desparafinização.

- Xilol III, por 10 minutos
- Xilol II, por 5 minutos
- Xilol I, por 5 minutos

Após os processos de desparafinização, as lâminas foram reidratadas e coradas.

- Álcool e Xilol 50% por 5 minutos
- Álcool absoluto III, por 5 minutos
- Álcool absoluto II, por 5 minutos
- Álcool absoluto I, por 5 minutos
- Álcool 95%, por 5 minutos
- Álcool 90%, por 5 minutos
- Álcool 80%, por 5 minutos
- Álcool 70%, por 5 minutos
- Lavar com água corrente, por 5 minutos
- Corar com hematoxilina, por 10 minutos
- Lavar em seguida com água corrente
- Corar com Eosina por um minuto
- Lavar rapidamente em água corrente

Após o processo de reidratação e coloração, as lâminas foram desidratadas.

- Álcool 80%, por 20 segundos
- Álcool 95%, por 20 segundos
- Álcool absoluto I, por 4 minutos
- Álcool absoluto II, por 4 minutos
- Álcool absoluto II, por 4 minutos
- Álcool Xilol 50%, por 4 minutos
- Xilol I, por 4 minutos
- Xilol II, por 4 minutos

- Xilol III, por 4 minutos

Em seguida, montar as lâminas com lamínulas, utilizando resina ou bálsamo.

Coloração com Tricrômico de Gomori

As lâminas (com os cortes) passaram pelo processo de desparafinização.

- Xilol III, por 10 minutos
- Xilol II, por 5 minutos
- Xilol I, por 5 minutos

Em seguida, as lâminas foram reidratadas e coradas.

- Álcool absoluto I por 5 minutos
- Álcool 95%, por 5 minutos
- Álcool 90%, por 5 minutos
- Álcool 80%, por 5 minutos
- Álcool 70%, por 5 minutos
- Lavar com água corrente, durante 5 minutos
- Corar com Gomori, por 10 minutos a 15 minutos
- Diferenciar em água acidificada pelo ácido acético por um minuto
- Lavar em água corrente por 3 minutos

Após o processo de reidratação e coloração, as lâminas (com os cortes) foram desidratadas.

- Álcool 80%, por 20 segundos
- Álcool 95%, por 20 segundos
- Álcool absoluto I, por 4 minutos
- Álcool absoluto III, por 4 minutos
- Álcool absoluto III, por 4 minutos
- Xilol I, por 4 minutos
- Xilol II, por 4 minutos
- Xilol III, por 4 minutos

Em seguida, montar as lâminas com lamínulas e com resina ou bálsamo.

Coloração com Azul de Toluidina

As lâminas com os cortes foram desparafinizadas.

- Xilol III, por 10 minutos
- Xilol II, por 5 minutos
- Xilol I, por 5 minutos

Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente por três minutos e incubadas na solução de ácido fucsina-orange G, por um minuto. Logo após, as lâminas passaram pelos seguintes processos:

- Álcool 60%, por 2 minutos
- Corar na solução de azul de toluidina 0,5%, por 1 minuto
- Álcool 60%, por 1 minuto
- Álcool absoluto, por 1 minuto
- Xilol, por 5 minutos

Em seguida, montar as lâminas com lamínulas e com resina ou bálsamo.

Preparo do material para imuno-histoquímica

Após a inclusão em parafina, os fragmentos da mama normal e da mama cancerosa, de ambas as espécies, foram cortados em micrótomo, com espessura de 3 µm, e os cortes com os tecidos foram montados nas lâminas. Depois disso, seguiram-se os seguintes passos (Técnica descrita por Hsu *et al.*, 1981, e modificada por Vilela *et al.*, 1987):

- Desparafinizar os cortes:

Xilol I _____ 10 minutos

Xilol II _____ 10 minutos

Álcool 70% _____ 10 minutos

- Inibir a peroxidase endógena, com 1,0% H₂O₂, em metanol, por 20 minutos (a solução deve ser preparada no momento do uso);

- Lavar bem com água destilada, utilizando pisseta.

- Aquecer a água destilada a 37°C e deixar as lâminas submersas durante 5 minutos.
 - Tratar com 0,1% de tripsina (Biobrás), em 0,1% de CaCl₂ (cloreto de cálcio) e ajustar o pH para 7,8, com 0,1 de NaOH), a 37°C, por 15 minutos a 30 minutos;
 - Lavar com água fria, sob agitação, durante 2 minutos a 3 minutos;
 - Lavar bem, com TBS (tampão);
 - Usar a solução bloqueadora por 30 minutos (1% Soro Albumino Bovino + Meio de cultura DMEM + 20% Soro Fetal Bovino);
 - Lavar bem, com TBS (exceto o controle negativo), durante 5 minutos;
 - Aplicar o anticorpo primário anti-desmogleína-1 (32-2B), por 2 horas;
 - Lavar bem, com TBS, por 5 minutos;
 - Aplicar anti-mouse Ig biotinilado (anticorpo secundário, diluído 1:75), por 1 hora, em todas as lâminas e no controle negativo;
 - Lavar bem, com TBS;
 - Aplicar o complexo estreptavidina-biotina peroxidase (ABC), por 15 minutos (Kit Vectastain-Vector);
- 1 gota ____A
- 1 gota ____B
- Repouso, por 1 hora
- Acrescentar 2,5 ml de TBS

- Lavar bem, com TBS, por 5 minutos;
- Aplicar substrato DAB (diaminobenzidina), por 10 minutos (DAKO K3465);
DAB líquido ____ 1 gota/ml
1 ml tampão do Kit DAB
- Lavar com TBS e, em seguida, lavar com água destilada, por 5 minutos;
- Contracorar com hematoxilina, por 3 minutos, enxaguar e aplicar álcool amoniacoal 1%, por 1 minuto;
- Desidratar (passar em uma seqüência de álcool);
Álcool 96% _____ 10 minutos
Álcool 96% _____ 10 minutos
Álcool absoluto _____ 15 minutos
- Deixar no xilol por 10 minutos e, em seguida, montar as lâminas.

Soluções e reagentes

Meio de cultura

Meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagles Medium”-(DMEM, SIGMA7777);

- 13,5 g
- Bicarbonato de sódio - 3,7 g
- Água Milli-Q - 1,0 l

Após ajustar o pH para 7,2 - 7,4, procedeu-se a sua esterilização por filtração, em filtro Milipore, com membrana de 0,22 µm, em fluxo laminar. O meio de cultura foi aliquoteado (ainda dentro do fluxo laminar) em garrafas estéreis de volume igual a 125 ml

e estocados a 4°C até o uso. Este meio de cultura foi denominado *meio de cultura incompleto*.

Meio de cultura completo (MC)

- 80 ml de meio de DMEM (SIGMA 7777);
- 20 ml de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, MAT CULT CEL LTDA);

Soro fetal bovino (FCS)

• Foram feitas alíquotas de 20 ml de soro fetal bovino (CULTILAB MAT CULT CEL LTDA), em tubos de ensaio com tampa rosqueável, previamente autoclavados, e em seguida, foram armazenados a -20°C.

Meio completo suplementado (MCS)

- 80 ml de meio de DMEM (SIGMA 7777);
- 20 ml de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB MAT CULT CEL LTDA)
- 1 ml de solução de antibióticos - Penicilina/Streptomicina/Fungizona;
- 200 µL de hidrocortisona;
- 10 µL EGF (Fator de Crescimento Epidermal);
- 10 µL de insulina
- 10 µg de cólera toxina

Dentro do fluxo laminar, o meio de cultura foi suplementado e, em seguida, armazenado a 4°C.

Solução de antibióticos

- Penicilina - 200.000 U (U-unidade)
- Estreptomicina - 200 mg

- Anfotericina-B - 500 µg
- Água Milli-Q - 20,0 ml

Fator de Crescimento Epidermal

- 0,2 mg - Fator de crescimento epidermal (EGF) (SIGMA E9644-2MG)
- 1 ml PBS (Tampão)

Dentro do fluxo laminar, o EGF foi diluído em 1 ml de PBS, aliquotado em eppendorf e armazenado a -20°C.

Hidrocortisona (SIGMA H6909)

- 10 ml
- Concentração - 50 µM

Cólera toxina

- 10 mg/ml

Insulina

- 100 U-10 ml

PBS (Tampão fosfato) estéril

- Cloreto de sódio - 4 g
- Fosfato diácido de potássio - 1 g
- Fosfato monobásico de sódio - 7,75 g
- Água destilada - 5,0 l

Ajustar o pH para 7,4, aliquotar em garrafas de vidro com tampas rosqueáveis, autoclavar e armazenar a 4°C.

Solução de tripsina estéril

- Tripsina - 0,25 g
- Fosfato de sódio - 0,71 g
- Cloreto de sódio - 0,90 g
- EDTA - 0,05 g
- Água Milli-Q - 100 ml .

Após o ajuste do pH para 7,4, a solução foi esterilizada por filtração, em membrana de 0,22 µm. Foram feitas alíquotas de 1 ml e de 2 ml e armazenadas a -20°C, até o uso.

Formaldeído tamponado

- 270 ml de formaldeído P.A
- 365 ml PBS
- 367 ml água destilada

Anticorpos

- Anticorpo monoclonal anti-desmogeína-1- (32-2B) (VILELA *et al.*, 1987).
- Anticorpo secundário anti-mouse - IgG

Tampão TBS

- Cloreto de sódio_____32 g
- Tris_____2,42 g

Água destilada para completar quatro litros, em seguida ajustar o pH para 7,6, com ácido clorídrico.

Solução de Ácido Fucsina-Orange G

- Ácido fucsina _____ 2,0 g
- Orange G _____ 2,0 g
- Água destilada _____ 400 ml

Solução Azul de Toluidina

- Azul de Toluidina _____ 0,5 g
- Água destilada _____ 100 ml

Solução de Tricrômico de Gomori

- Cromotrope 2R _____ 0,6g
- Fast Green FCF (verde rápido) _____ 0,3g
- Ácido fosfotungstico _____ 0,6g
- Ácido Acético glacial _____ 1mL
- Água destilada _____ 100 mL

Solução Água Acidificada

- Ácido fosfotúngstico _____ 0,7 g
- Ácido acético _____ 1 ml
- Água destilada _____ 10 ml