



# **AVALIAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES OBTIDAS DE PACIENTES CANINOS: CARACTERIZAÇÃO DO TUMOR DESENVOLVIDO POR XENOENXERTO**

**Palavras-Chave:** CÂNCER CANINO, LINHAGEM CELULAR, MODELO XENOGRÁFICO

**Autores(as):**

**SABRINA CARVALHO BRUNELLI, FCF – UNICAMP**

**INGRID MAYARA CAVALCANTE TREVISAM, FCF – UNICAMP**

**CIBELE PEREIRA MARIANO, FCF – UNICAMP**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. CATARINA RAPOSO (orientadora), FCF - UNICAMP**

---

## **INTRODUÇÃO:**

O câncer, atualmente, é uma das principais causas de mortalidade de cães domésticos (BASTOS et al., 2017). Dentre os tipos de tumores que acometem esses animais, os mamários apresentam grande importância médica, pois representam cerca de 50% das neoplasias que são diagnosticadas, das quais metade são malignas (NELSON & COUTO, 2015). O estudo dessa doença em cães demonstra sua importância não apenas pela alta frequência de casos, mas também por suas semelhanças moleculares aos tumores humanos. Dessa forma, os tumores caninos representam um relevante modelo para estudos pré-clínicos na busca do desenvolvimento de novos tratamentos (FONSECA et al., 2000; EISENBERG et al., 2001).

Diversas abordagens terapêuticas são aplicadas em cães que sofrem com essa doença, dentre elas, pode-se citar a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, que podem ser utilizadas de forma isolada ou com terapia neoadjuvante (KIDD, 2008). Entretanto, mesmo com a existência de diversas formas de tratamento, muitos pacientes apresentam resistência a ele e recidivas em decorrência da heterogeneidade do câncer (WITHROW & VAIL, 2007). Com isso, os tratamentos individualizados são essenciais para o combate à doença.

A terapia baseada na medicina de precisão é uma maneira de individualizar o tratamento. Essa técnica pode ser empregada por meio de uso de modelos *in vitro*, com células tumorais isoladas do próprio paciente. Com isso, há possibilidade de realizar ensaios de resposta individual dos tumores aos

tratamentos e fazer uma correlação dessa resposta com o perfil molecular da neoplasia. Para isso, se emprega a cultura de células, que apresenta diversas vantagens em sua utilização, dentre elas destacam-se a homogeneidade da amostra e o controle do ambiente (ALVES et al., 2010). Nesse sentido, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa estabeleceram linhagens de tumores de pacientes caninos. As linhagens foram cultivadas até a 10<sup>o</sup> passagem, quando foram congeladas e consideradas estabelecidas. Entretanto, essas linhagens devem ser validadas para serem utilizadas na medicina de precisão.

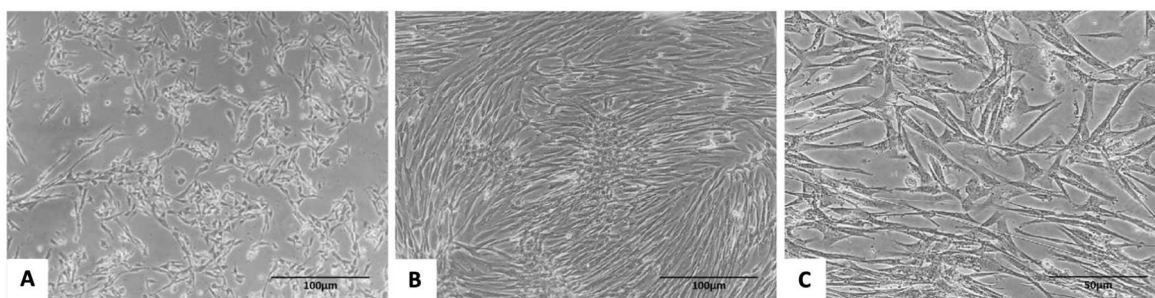
Um dos métodos que podem ser utilizados na validação de linhagens celulares é o modelo de xenoenxerto, que permite validar a capacidade da linhagem estabilidade de formar uma massa tumoral maligna. Nesse processo, as células do paciente, nesse caso canino, são enxertadas em camundongos imunocomprometidos. Os cânceres estabelecidos com esse método podem reter a heterogeneidade molecular característica do tumor original do paciente (HIDALGO et al., 2014; TENTLER et al., 2012). Esse modelo permite elucidar diversas questões referentes ao câncer, por fornecer dados sobre a progressão tumoral, aspectos de invasão do tecido, características histopatológicas, entre outros (PANTALEÃO et al., 2010).

Com isso, o presente trabalho visa realizar a validação das linhagens celulares de câncer canino (Melanoma oral - PF11C, Mastocitoma cutâneo canino - DF13C e Carcinoma mamário - PF12C) obtidas pelo grupo de pesquisa em trabalho prévio, por meio do desenvolvimento tumoral por xenoenxerto. O modelo estabelecido será relevante para futuros projetos envolvendo medicina de precisão, bem como outras análises referentes aos tumores mamários. A linhagem estabelecida ficará disponível no banco de células do laboratório para outros pesquisadores da Instituição e do Brasil.

## **METODOLOGIA:**

Para indução do tumor proveniente das linhagens celulares, foram utilizados camundongos da linhagem RAG-/- (B6.129S7-Rag1tm1Mom), adultos (com 8-10 semanas de idade), machos, obtidos no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos no Biotério de Animais da Área de Imunologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia/UNICAMP, em gaiolas do tipo microisolador, com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas e água e alimento fornecidos *ad libitum*. O protocolo experimental seguiu os cinco princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP) e aprovado sob o número 6200-1/2023.

As linhagens celulares (PF11C, DF13C e PF12C) (**Figura 1**) foram descongeladas e mantidas em garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, em meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 mg/mL de L-glutamina, Penicilina e Estreptomicina (Gibco Inc., Billings, MT, USA), em estufa de CO<sub>2</sub> 5%, a 37 °C. As células foram observadas até que atingissem aproximadamente 95% de confluência da garrafa de cultura, elas foram então repicadas utilizando cell scraper, lavadas 3x com PBS 1M, contadas e inoculadas nos animais (Tabela 1).



**Figura 1.** Linhagens celulares estabelecidas a partir de neoplasias caninas coletadas de pacientes na Oncovida Centro de Oncologia Veterinária, Campinas/ SP. A) Linhagem celular de Melanoma Oral (PF11C). B) Linhagem celular de Mastocitoma Cutâneo Canino (DF13C). C) Linhagem celular de Carcinoma mamário (PF12C).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os animais receberam inoculação e foram monitorados em relação à progressão do tumor por até 40 dias, ou assim que houvesse uma massa tumoral palpável ou visível. Foram inoculadas  $2 \times 10^5$  células da linhagem PF12C em fêmeas (n=2) de forma subcutânea na região da glândula mamária abdominal. No período de 30 dias não houve crescimento tumoral, o que motivou a repetição do experimento, com inoculação de  $1,5 \times 10^5$  células em machos (n=4), de forma subcutânea no dorso, e de  $3 \times 10^5$  células em fêmeas (n=2), na glândula mamária abdominal. Nesses dois experimentos também não houve crescimento de tumor. Com isso, optou-se por realizar a validação de outras linhagens de células, (mastocitoma cutâneo canino – DF13C) (n=4) e (melanoma oral canino - PF11C) (n=4). O grupo controle (n=5) recebeu inoculação apenas de PBS (1M). A **Tabela 1** descreve as concentrações celulares e locais de inoculação das 3 linhagens no modelo animal.

**Tabela 1.** Desenhos experimentais para cada linhagem de célula utilizada.

Linhagem	Quantidade de células inoculadas	Local de inoculação	Sexo
PF12C	$2 \times 10^5$	glândula mamária abdominal	Fêmea
	$1,5 \times 10^5$	dorso	Macho
	$3 \times 10^5$	glândula mamária abdominal	Fêmea
PF11C	$3 \times 10^5$	flanco	Macho
DF13C	$3 \times 10^5$	dorso	Macho

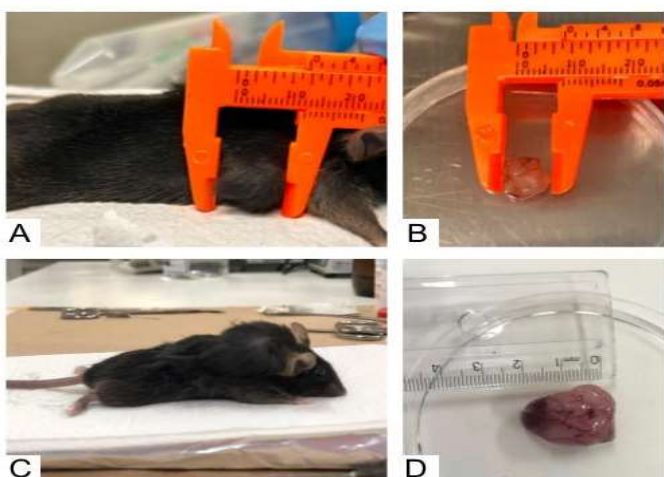
Os animais foram monitorados a cada 48h em que foram realizadas análises de seus parâmetros de bem-estar e saúde. Foram avaliados: Ingestão de alimentos (pesagem da ração); Ganho ou perda de peso (pesagem do animal); Sobrevida total; Presença de dor (sinais como: postura encolhida, pouco movimento, olhos entreabertos, tremores, pelos eriçados); Progressão tumoral (medição do tumor com paquímetro e, ao final, pesagem e medidas do tumor dissecado; surgimento de metástase ou ascite).

Após crescimento tumoral, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta dos tumores.

Os tumores foram dissecados, pesados, medidos e seccionados em 2 partes, das quais uma foi processada em parafina para análise histopatológica e imunohistoquímica, e a outra parte foi destinada para cultura celular. Na análise histopatológica, foram avaliadas as características dos tumores, como pleomorfismo nuclear, figuras de mitose, infiltração celular e aspecto da cromatina; a imunohistoquímica identificou a expressão de fatores de diagnóstico, utilizando os seguintes marcadores: C-KIT II e Triptase (linhagem DF13C) e marcadores de melanoma Melan-A e HMB45 (linhagem PF11C).

Para análise dos dados de bem estar geral dos animais, o nível de significância entre o grupo experimental (com inoculação do tumor) e controle foi analisado usando o teste t-student. As análises foram realizadas utilizando GraphPad 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) e foram considerados os seguintes níveis de significância:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

A linhagem tumoral PF12C foi incapaz de formar tumor pelo modelo de xenoenxerto, enquanto as linhagens DF13C e PF11C mantiveram sua capacidade tumorigênica (**Figura 2**). Os parâmetros de bem



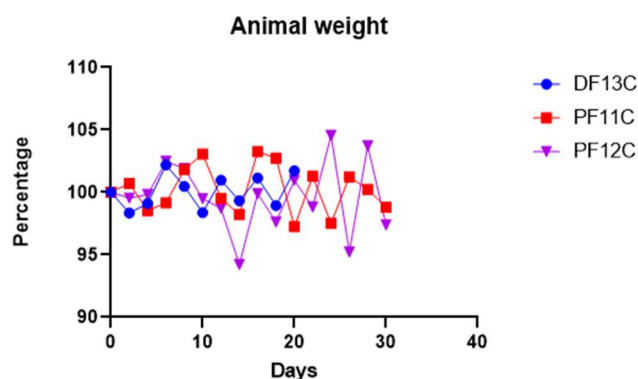
**Figura 2.** Desenvolvimento de tumor em camundongos inoculados com as linhagens celulares. **A)** Tumor sólido de PF11C. **B)** xenoenxerto - PF11C. **C)** Tumor sólido de DF13C. **D)** Xenoenxerto - DF13C.

características de células epitelióides relativas ao sarcoma (**Figura 4A**). Na imunohistoquímica, as células imunoexpressaram C-KIT II (**Figura 4B**) (padrão citoplasmático focal) e se apresentaram fraco positivas para Triptase, favorecendo o diagnóstico de mastocitoma pouco diferenciado (**Figura 4C**).

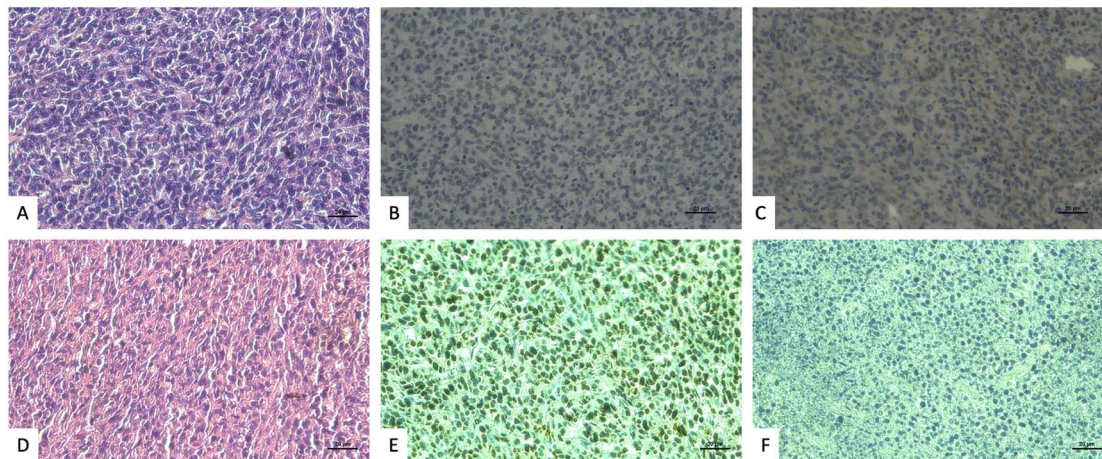
A avaliação histopatológica do tumor da linhagem PF11C demonstrou morfologia das células fusiformes (**Figura 4D**), também foi realizada a avaliação imunohistoquímica, e as células imunoexpressaram MELAN-A favorecendo o diagnóstico de melanoma (**Figura 4E**), já o marcador HMB-45 não apresentou padrão de marcação (**Figura 4F**).

estar geral, crescimento tumoral, peso dos animais e consumo de ração dos camundongos foram avaliados (**Figura 3**). Durante todo o período do experimento, não foram detectados sinais de dor em nenhum grupo. Apenas o grupo PF12C apresentou uma variação de peso ao longo dos 30 dias de experimentação.

A análise histopatológica sugere outra classe de tumor para a linhagem DF13C, pelas



**Figura 3.** Gráfico de ganho de peso dos camundongos. Software GraphPad Prism.



**Figura 4.** Análise histopatológica e imunohistoquímica dos tumores DF13C e PF11C, coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). **A)** Neoplasia maligna de células epitelióides. **B)** Imunomarcagem do marcador triptase fraco positivo. **C)** Imunoexpressão do marcador C-KIT II fraco favorecendo o tumor Mastocitoma. **D)** Neoplasia maligna de células fusiformes **E)** Imunoexpressão do marcador Melan-A favorecendo o diagnóstico de melanoma **F)** Imunoexpressão do marcador HMB-45 sem expressão nas células.

## CONCLUSÕES:

A cultura das células e a indução do tumor das linhagens PF11C e DF13C foi feita com sucesso. A análise histopatológica e imunohistoquímica das linhagens DF13C e PF11C confirmaram o diagnóstico de mastocitoma pouco diferenciado e melanoma cutâneo, validando essas linhagens. A dificuldade encontrada no desenvolvimento tumoral com a linhagem PF12C pode ser resultado do grau primário do tumor e perda das atipias celulares do tumor primário.

## BIBLIOGRAFIA:

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Cultivo celular**. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV, p. 215-253, 2010.
- BASTOS, R. S. C., FARIAS, K. M. de, LOPES, C. E. B., PACHECO, A. C. L., VIANA, D. de A. **Estudo retrospectivo de neoplasias cutâneas em cães da região metropolitana de Fortaleza**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 11, n.1, p. 39-53. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20170005>. 2017.
- DAY, C. P., MERLINO, G., DYKE, T. V. **Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges**. Cell. v. 163, n. 1, p. 39-53. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.068. 2015.
- EISENBERG, A. L. A., KOIFMAN, S. **Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura)**. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 27, n. 4, p. 377-388. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2001v47n4.2300>. 2001.
- FERREIRA, L. M., HOCHMAN, B., BARBOSA, M. V. J. **Modelos experimentais em pesquisa**. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 20, supl. 2. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502005000800008>. 2005.
- FONSECA, C. S., DALECK, C. R. **Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante**. Ciência Rural, v. 30, n. 4, p. 731-735. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000400030>. 2000.
- HIDALGO, M., AMANT, F., BIANKIN, A. V., BUDINSKA, E., BYRNE, A. T., CALDAS, C., CLARKE, R. B., DE JONG, S., JONKERS, J., MAELANDSMO, G. M., ROMAN-ROMAN, S., SEOANE, J. TRUSOLINO, L., VILLANUEVA, A. **Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research**. Cancer discovery; v. 4, n.9, p.998-1013. [PubMed: 25185190]. 2014.
- KIDD, C. **The many challenges of veterinary oncology**. Can Vet J, v. 49, n. 11, p. 1132-1135. PMID: 19183739. 2008.
- MEDEIROS, J. A. de, NIRO, C. M. (Org.). **Anais da III mostra dos trabalhos de conclusão de curso da especialização em vigilância laboratorial em saúde pública**. Jardim do Seridó, RN: Editora Agron Science, p. 18-23. ISBN: 978-65-00-47531-9. 2022.
- NARDI, A. B. de, RODASKI, S., SOUSA, R. S., COSTA, T. A., MACEDO, T. R., RODIGHERI, S. M., RIOS, A., PIEKARZ, C. H. **Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná**. Archives of Veterinary Science, v. 7, n. 2, p. 15-26. ISSN: 1517-784X. 2002.
- NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 5. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. ISBN: 978-85-352-7906-1. 2015.
- PANTALEÃO, C., LUCHS, A. **Câncer e modelos experimentais de tumores murinos**. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 69, n.4, p. 439-445. 2010.
- SINHA, P. et al. **Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells**. Cancer Research, v. 67, n. 9, p. 4507-4513. 2007.
- TENTLER, J. J., TAN, A. C., WEEKES, C. D., JIMENO, A., LEONG, S., PITTS, T. M., ARCAROLI, J. J., MESSERSMITH, W. A., ECKHARDT, S. G. **Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development**. Nat Rev Clin Oncol, v. 9, n.6, p. 338-350. [PubMed: 22508028]. 2012.
- WITHROW, S. J., VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's: Small Animal Clinical Oncology**. 4. Ed. St. Louis, Missouri: Elsevier. ISBN-13: 978-0-7216-0558-6. 2007.