

Atividade do sulfato de vincristina em cultivos primários de tumores mamários caninos

Activity of vincristine sulfate on the primary culture of canine mammary tumor

Neide Mariko Tanaka^[a], Mayara Suellen Castilho de Faria Maeda^[b], Leila Isono Pereira^[b], Renata Cilião de Araújo^[b], Bernardo Kemper^[c], Raquel Cristina Gonçalves^[d], Luiz Cesar da Silva^[e], Flávia Navas Padilha^[f], Sílvia Manduca Trapp^[g], Selwyn Arlington Headley^[h]

^[a] Médica-veterinária, Ph.D. em Cirurgia Oncológica pela Universidade Tóquio, Japão, professora titular da Universidade Norte do Paraná (Unopar), Londrina, PR - Brasil, e-mail: neidemtanaka@gmail.com

^[b] Médicas-veterinárias pela Universidade Norte do Paraná (Unopar), Londrina, Apucarana, Arapongas, PR - Brasil, e-mails: mayara.maeda@hotmail.com, isono_leila@hotmail.com, renataciliao@hotmail.com

^[c] Médico-veterinário, mestre em Cirurgia Veterinária pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), professor adjunto da Universidade Norte do Paraná (Unopar), Londrina, PR - Brasil, e-mail: bkemper@bol.com.br

^[d] Médica-veterinária, mestre em Anestesiologia pela Universidade Estadual Paulista (Unesp – Botucatu), Agropecuária Lafrancchi, Londrina, PR - Brasil, e-mail: racrisgon@hotmail.com

^[e] Médico-veterinário, doutor em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses pela Universidade de São Paulo (USP), professor titular da Universidade Norte do Paraná (Unopar), Arapongas, PR - Brasil e-mail: silvaluizcesar@gmail.com

^[f] Médica-veterinária, especialista em Clínica Cirúrgica de Animais de Companhia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), professora assistente da Universidade Norte do Paraná (Unopar), Londrina, PR - Brasil, e-mail: flavianavas@ymail.com

^[g] Médica-veterinária, doutora em Cardiologia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista (Unesp – Botucatu), professora titular da Universidade Norte do Paraná (Unopar), Arapongas, PR - Brasil, e-mail: smanducatrap@gmail.com

^[h] Médico-veterinário, doutor em Patologia Animal pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), professor titular do Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes da Universidade Norte do Paraná (Unopar), Arapongas, PR - Brasil, e-mail: headleysa@gmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade antiproliferativa do sulfato de vincristina em cultivos de tumores mamários caninos *in vitro* por meio da determinação de concentração inibitória e estabelecimento do estadiamento clínico. Amostras frescas obtidas de 20 pacientes caninas com neoplasia mamária foram fatiadas e cultivadas individualmente na presença e ausência de sulfato de vincristina durante três dias para determinar a viabilidade e a citotoxicidade. Quinze amostras apresentaram sensibilidade ao sulfato de vincristina proporcional à dose. Amostras com o estágio clínico avançado apresentaram crescimento celular correlacionado ao potencial proliferativo dos tumores malignos de se desenvolverem melhor que os benignos em cultivo celular. Concluiu-se que o método utilizado pode ser adaptado como modelo de aplicabilidade no estudo de resposta tumoral a drogas antitumorais em cultivos primários.

Palavras-chave: Vincristina. Quimioterapia. Tumores de mama. Cão. *In vitro*.



Abstract

The aim of this study was to analyze the antiproliferative activity of vincristine sulfate on canine mammary tumor cells in vitro through the determination of its inhibitory concentration and clinical staging establishment. Samples obtained from 20 patients with mammary neoplasia were sliced and individually cultured on the presence or absence of vincristine sulfate during three days to determine viability and cytotoxicity parameters. Fifteen samples showed sensitivity to vincristine sulfate in a dose-dependent manner. Tumor samples in advanced clinical stage showed cellular growth correlated to the proliferative potential of malignant tumors to develop better than benign tumors in cell culture procedures. This method may be adapted as a model to apply on the study of tumoral cell response to antitumoral drugs in primary culture.

Keywords: Vincristine. Chemotherapy. Breast neoplasm. Dog. In vitro.

Introdução

Tumores mamários são as neoplasias mais comuns em cães, e são caracterizados como doenças refratárias. Recidivas e metástases são frequentes. A ocorrência de neoplasias mamárias representa cerca de 50% dos tumores em cadelas entre 6 e 9 anos, e destes, metade são diagnosticados como malignos (CASSALI et al., 2011).

O risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias varia entre cadelas. Fêmeas da espécie canina não esterilizadas cirurgicamente apresentam prevalência de tumores mamários de quatro a sete vezes maior quando comparadas às fêmeas submetidas a ovariectomia antes do primeiro estro (DE NARDI et al., 2002). Os hormônios sexuais estão envolvidos na patogênese dessas neoplasias, e a castração até o segundo estro, apresenta influência sobre o seu desenvolvimento (FELICIANO et al., 2008). A ovariectomia realizada no momento da exérese cirúrgica do tumor de mama não tem efeito protetor sobre o aparecimento de novos tumores, metástases ou mesmo sobre o prolongamento de vida do paciente (FONSECA; DALECK, 2000).

Para a obtenção de diagnóstico, a biópsia aspirativa por agulha fina pode ser indicada como um método auxiliar de utilização simples e imediata. É um procedimento rápido, barato e seguro, induz injúria tecidual mínima, não havendo necessidade de se proceder à anestesia do animal. Ela permite a obtenção de resultados confiáveis na maioria dos casos, proporcionando ao clínico uma conduta rápida e objetiva com relação ao prognóstico e tratamento de seu paciente (CASSALI et al., 1999; OLIVEIRA FILHO et al., 2010;

PEREIRA et al., 2009; PLIEGO et al., 2008; ZUCCARI; SANTANA; ROCHA, 2001).

O método adequado e definitivo para a classificação detalhada de neoplasias mamárias em cadelas, principalmente na caracterização de tumores malignos é o exame histopatológico, que além de concluir o diagnóstico, oferece importantes informações prognósticas como o grau histopatológico e o comportamento tumoral (DALECK et al., 1998).

Exame radiográfico completo do tórax deve ser realizado para detecção de metástase e o estabelecimento do prognóstico. Três posições laterolateral direita e laterolateral esquerda e ventrodorsal são necessárias. O uso da ultrassonografia no diagnóstico de neoplasia mamária em cadelas ainda é restrito, particularmente pela falta de estudos que correlacionem os achados macroscópicos e microscópicos das neoplasias com as imagens ultrassonográficas. Esse método de diagnóstico é mais amplamente utilizado para a detecção de metástase em órgãos abdominais. Já a dopplervelocimetria colorida associada à ultrassonografia convencional tem mostrado alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico dos tumores mamários. A sensibilidade do método em diferenciar tumores benignos de malignos varia entre 91 a 95%, com especificidade de 89 a 97% e acurácia de 90%. O exame se baseia no aumento da vascularização e da neovascularização nas neoplasias. As lesões malignas costumam apresentar maior vascularização que as benignas e, às vezes, é possível observar neovascularização no interior dos tumores malignos. Adicionalmente, a vascularização está relacionada com a invasividade (FELICIANO et al., 2008).

As metástases e recidivas são as principais complicações das neoplasias malignas com localização

nas mamas, sendo os nódulos linfáticos regionais e os pulmões os mais frequentemente afetados; e outros órgãos são afetados com menor frequência como o fígado, coração, rim, baço, adrenais e encéfalo (DALECK et al., 1998; OLIVEIRA FILHO et al., 2010). A drenagem linfática dos tumores mamários caninos é complexa e com existência de comunicações linfáticas entre a cadeia mamária direita e esquerda e entre glândulas adjacentes de uma mesma cadeia; isso contribui para a metastização (FELICIANO et al., 2008). Em trabalho realizado por Oliveira Filho et al. (2010), o carcinoma simples, carcinosarcoma, tumor misto maligno, carcinoma complexo e o carcinoma em tumor misto foram os tipos histológicos mais prevalentes nas metástases para linfonodos.

A condição dos linfonodos, o tamanho dos nódulos, a presença de ulceração, e envolvimento de cavidades serosas são fatores com importantes implicações terapêuticas e prognósticas nos casos de neoplasias mamárias. Oliveira Filho et al. (2010) citam a condição dos linfonodos como um importante fator prognóstico, pois o tempo de sobrevida é inferior a dois anos para 85,7% dos cães com metástases para linfonodos. Os autores também descrevem que, de acordo com o tamanho do nódulo, é possível estabelecer um melhor prognóstico.

O tratamento de eleição é a exérese cirúrgica do tumor (CIRILLO, 2008; DE NARDI et al., 2002), enquanto a quimioterapia e a radioterapia são também indicadas. Para a escolha da medicação quimioterápica, deve-se considerar: (1) classificação histopatológica do tumor; (2) classificação de acordo com o sistema TNM (tumor-nódulo-metástase) em que são classificados em estágios de I a V de acordo com o diâmetro do tumor, envolvimento de linfonodos regionais e presença de metástase; (3) estado geral do animal; e (4) os efeitos colaterais que podem decorrer da aplicação dos fármacos, como mielossupressão e toxicidade gastrointestinal devido à predileção dos quimioterápicos por células em intensa atividade proliferativa. Em relação ao nível hematológico periférico, a toxidade pode acarretar diminuição no número de glóbulos brancos, trombocitopenia e anemia. Na medula óssea, a agressão se traduz por destruição das células do compartimento de multiplicação e maturação celular, bem como de células maduras funcionais, podendo, também,

ocorrer destruição das células tronco (CIRILLO, 2008; DALECK et al., 1998).

A quimioterapia é um tratamento adjuvante cuja finalidade é evitar recidivas locais e metástases e também em casos em que já houve metástase para os linfonodos regionais, ou nos pulmões ou em outros locais. Nesses casos, a quimioterapia é apenas paliativa, porém, não é inútil, pois a qualidade de vida pode melhorar, e em alguns casos, as metástases podem regredir, prolongando, dessa forma, a sobrevida do paciente (CIRILLO, 2008; WATANABE et al., 2009).

No carcinoma inflamatório, tumor mamário de pior prognóstico, ou em extensão metastática na pele, os resultados da quimioterapia não são satisfatórios, com fracasso terapêutico quase total. Deve-se considerar a idade do animal, assim como o seu estado geral, na escolha da(s) medicação(ões) quimioterápica(s) mais apropriada(s) de acordo com o diagnóstico histopatológico do tumor (CIRILLO, 2008; CLEMENTE et al., 2009).

Os principais quimioterápicos antineoplásicos empregados no tratamento das neoplasias mamárias são a doxorrubicina, a ciclofosfamida e o 5-Fluorouracil (CIRILLO, 2008; DALECK et al., 1998). Outros fármacos menos utilizados são o sulfato de vincristina, que pode ser associada à doxorrubicina e à ciclofosfamida; mitoxantrona, em substituição à doxorrubicina em virtude da cardiotoxicidade desta. A maioria dos protocolos quimioterápicos usados na medicina veterinária são originariamente associações dos protocolos aplicados para tratamento de pacientes humanos e tem uma similaridade de atividade de espectro (WITHROW; VAIL, 2007). Segundo Ershler (1992), em pacientes com idade avançada, a redução em certas funções orgânicas, está associada a deficiências que podem ser magnificadas pela condição comórbida. Portanto, o tratamento do câncer, especialmente a quimioterapia, pode ser mais tóxica em pacientes idosos.

Outro benefício da quimioterapia adjuvante é oportunizar a avaliação da resposta tumoral *in vivo* e a possibilidade da determinação de fator preditivo na qual pode influenciar a decisão clínica a ser indicada no futuro. Entretanto, esse potencial ainda não é conhecido, e embora esse fator preditivo possa auxiliar na seleção de tratamento apropriado de cada paciente individualmente, até o momento, não existe um marcador com valor preditivo para resposta do paciente à quimioterapia (HORTOBAGYI, 2002). A avaliação de ensaios clínicos para avaliar

a eficácia da quimioterapia é pequena diante da alta ocorrência de tumor mamário. Itharat et al. (2004) e Rousseau et al. (2000) testaram agentes anticancerígenos com doses individualizadas, as quais foram adaptadas como método controle para testar a eficácia da terapêutica anticâncer.

Na imunoterapia, medicações antiestrogênicas como o tamoxifen foram testadas em cadelas com tumores mamários malignos. Estudos demonstraram que as cadelas sujeitas a tratamento com tamoxifen desenvolviam muitos efeitos secundários, deixando de ser recomendado para cães (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Os inibidores da Cicloxigenase-2 (Cox-2) estão relacionados com o aumento da expressão de Cox-2 em tumores mamários caninos, associada com tumores mais agressivos e de pior prognóstico. Fármacos como o Piroxicam, Docetaxel e Firocoxib já têm sido utilizados com melhoria das condições clínicas e aumento da sobrevida dos animais tratados (CASSALI et al., 2011).

Simon et al. (2001) estudaram a eficácia *in vitro* de quimioterápicos determinada pela concentração inibitória 50% em culturas de células de tumores da glândula mamária. As variações na suscetibilidade foram evidentes e enfatizam a importância de avaliar tais padrões de resistência para cada tipo de tumor.

Além disso, estudos como o de Konno (2004) sobre o efeito inibitório de crescimento do extrato bioativo do cogumelo maitake fração D em células cancerígenas caninas demonstraram que este composto é um potente agente natural que pode ser útil no tratamento de câncer canino.

Adlam, Dabbous e Wooley (2008) estudaram a aplicação de biossensor eletroquímico para determinar mudanças no potencial de células de adenocarcinoma mamário de ratos tratados *in vitro* com quatro medicações anticancerígenas (cisplatina, doxorrubicina, paclitaxel e vinblastina) para prever os efeitos *in vivo*. Observaram alterações induzidas pelas drogas em tempo real observado na monitoração eletroquímica das células.

Watanabe et al. (2009) pesquisaram a inibição de crescimento tumoral e análise de diferenciação celular em uma linhagem de células tumorais mamárias caninas (MCM B2) tratadas com quatro reagentes químicos: 5 *azactidine* (azaC), *all-trans-retinoid acid* (ATRA), *phorbol 12-myristate 13-acetate*,

(TPA) e *trichostatin* (TSA). Eles demonstraram a inibição no crescimento tumoral, a indução da diferenciação e o efeito antitumoral de cada um dos produtos químicos em fenótipos distintos do tumor mamário.

A caracterização da atividade antiproliferativa de agentes citotóxicos para cada tipo de tumor/paciente diagnosticado com tumor mamário e a avaliação dessa associação com a proposta terapêutica poderão contribuir na terapia e prognósticos mais precisos (SIMON et al., 2001).

Sulfato de vincristina é o sal de um alcaloide obtido de uma planta – a pervinca (*Vinca rosea Linn*) – e seu mecanismo de ação consiste na inibição da formação de microtúbulos intracelulares, importante na mitose celular. É amplamente utilizado como agente único ou em protocolo múltiplo quimioterápico na rotina da clínica veterinária. A vincristina ganhou sua aceitação na comunidade veterinária devido ao seu baixo custo e à associação na maioria dos protocolos dos pacientes oncológicos veterinários. A dose terapêutica do sulfato de vincristina é de 0,025 mg/kg (HARVEY, 1993; WITHROW; VAIL, 2007)

O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade antiproliferativa do sulfato de vincristina em cultivos *in vitro* de tumores mamários caninos por meio da determinação de concentração inibitória e a classificação do estadiamento clínico dos tumores.

Materiais e métodos

Amostras teciduais

Amostras de tecidos tumorais de 20 cadelas foram colhidas assepticamente por meio de mastectomias realizadas na rotina do Hospital Veterinário da Unopar durante maio e dezembro de 2011. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais n. 13/11.

Estadiamento clínico

As pacientes foram previamente avaliadas pelo histórico clínico e exame físico incluindo a mensuração do tumor mamário e palpação dos linfonodos inguinais e axilares. Radiografias torácicas foram realizadas para detectar possíveis metástases.

As pacientes foram classificadas de acordo com o estadiamento clínico das neoplasias utilizando-se o sistema tumor, nódulo, metástase (TNM) da OMS (OWEN, 1980). Fragmento de cada amostra tumoral foi analisado por exame histopatológico.

Cultivo tecidual

As amostras tumorais foram colhidas logo após remoção cirúrgica de forma asséptica. Os fragmentos foram mantidos em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com antibiótico (penicilina e estreptomicina) para transporte. Foram preparados e seccionados em pequenos fragmentos de 10 × 20 mm. Seis fragmentos foram fatiados a 0,3 – 0,4 mm e cultivados em meio de cultura (10 mL Eagle, suplementado com 10% soro fetal bovino e antibiótico 100 U/mL penicilina G) em placas de Petri (90 × 15 mm) e depois transferidos para placas

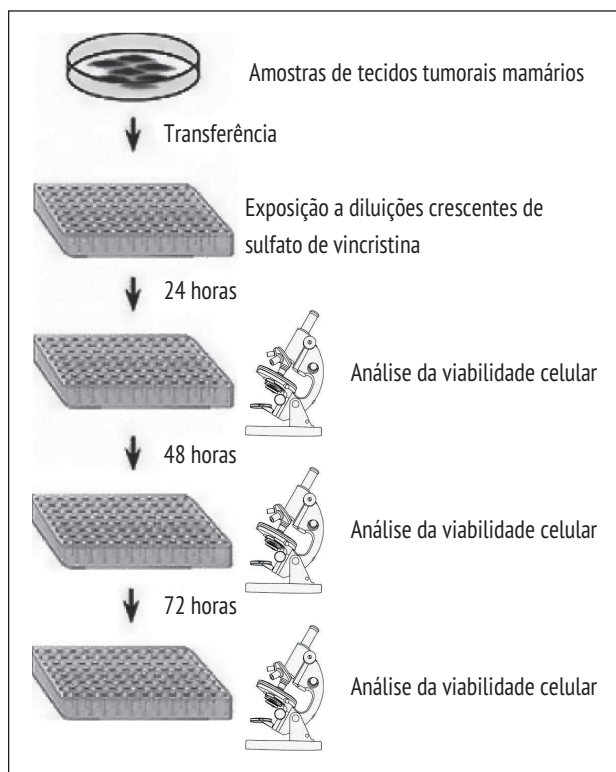


Figura 1 - Esquema demonstrativo do cultivo tumoral

Fonte: Dados da pesquisa.

(Figura 1). Do grupo controle de cada caso foi separado um fragmento contendo somente meio de cultura. Todas as amostras foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37 °C e 5% CO₂ (Figura 1) (FRESHNEY, 2002; SOBRAL et al., 2008).

Efeito do sulfato de vincristina no crescimento tumoral e determinação de concentração inibitória

As fatias foram expostas a cinco diluições crescentes de sulfato de vincristina em triplicata e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ (Figura 2).

Após cada período de tratamento (24, 48 e 72 horas), fatias (controle e tratamento) de cada tecido foram fixadas em formalina para análise histológica e contagem de células viáveis (Figura 1 e 2).

As respostas aos testes foram analisadas por meio de contagem de células das fatias fixadas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina

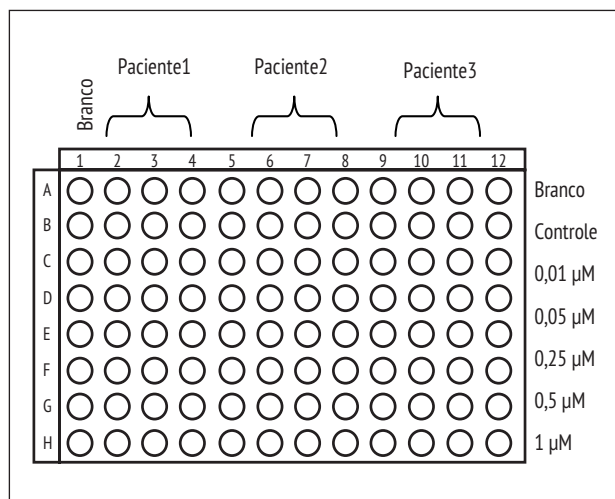


Figura 2 - Esquema representativo da determinação de concentração inibitória

Fonte: Adaptado de Gentox Laboratório de Genética Toxicológica¹.

na das fatias não expostas (controle) e das fatias correspondentes à exposição com sulfato de vincristina (Figura 1)

A determinação da concentração inibitória de 50% (CI-50) foi realizada por meio da análise de

¹ Disponível em: <http://gentox.bio.br/?page_id=3>. Acesso em: 1 abr. 2013.

inibição do crescimento das culturas com mensurações após 24, 48 e 72 horas de cultivo (Figura 1).

Análise estatística

A análise de significância estatística dos resultados qualitativos foi realizada por meio dos testes de Qui-quadrado ou Exato de Fischer. Para os dados quantitativos, foi utilizado o teste *t* de Student, ao nível de significância de 5% (MILTON, 1992).

Resultados

Das 20 amostras iniciais, 15 apresentaram viabilidade para o prosseguimento do estudo. Fatores como a contaminação e inviabilidade no cultivo de linhagem celular tentada no início inviabilizaram cinco amostras. Ao se adaptar o cultivo para fatias de tecidos, obtiveram-se condições para prosseguir o experimento (FRESHNEY, 2002; SOBRAL et al., 2008).

Baseado na avaliação clínica, a faixa etária das 15 pacientes com tumor mamário variou entre 4 e 15 anos. Sete animais tinham 8 anos

(53,33%), demais cadelas, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 e 15 anos (6,66% cada). Em relação às raças, foram atendidos cinco animais sem raça definida (33,33%), dois cockers spaniel (13,33%), dois dachshunds, dois rottweilers (13,33%), um schnauzer (6,66%) e um shitzu (6,66%). Dez animais não eram castrados (66,66%). Dos quinze, quatro (25,66%) recebiam ou já haviam recebido progestágeno. Os nódulos estavam assim distribuídos: sete (52%) em mamas abdominais, cinco (33,33%) em mamas inguiniais e três (16%) em mamas torácicas. O tamanho dos tumores variaram entre 0,5 e 20 cm de diâmetro. O tratamento indicado para todos os animais foi a mastectomia e, em seis pacientes, também foi realizado ovario-salpingo-histerectomia.

O estadiamento clínico demonstrou: sete pacientes T0N0M0, quatro pacientes T1N0M0, dois pacientes T2N2M1 e dois pacientes T4N0-1M0. A histopatologia revelou um sarcoma anaplásico, um adenocarcinoma túbulo papilar, e nove carcinoma simples, dois carcinoma complexos e dois carcinossarcomas (Quadro 1).

Quatro pacientes foram submetidos à eutanásia por causa da deterioração do quadro clínico.

As amostras de tecidos tumorais mamários foram expostas ao sulfato de vincristina nas concentrações

Quadro 1 - Características das pacientes quanto ao estadiamento clínico

Paciente	Idade	Raça	Castração	T	N	M	Estágio Clínico	Tipo de tumor	Grau histológico
1	4	Sem raça	X	1	(-)	0	T0N0M0	Carcinoma simples	I
2	11	Cocker Spaniel	X	1	(-)	0	T1N0M0	Carcinoma complexo	II
3	8	Sem raça	X		(-)		T0N0M0	Carcinoma simples	I
4	15	Daschund	X		(-)		T0N0M0	Carcinoma simples	I
5	8	Sem Raça	X	3	(-)	0	T4N0-1M0	Carcinossarcoma	II
6	8	Rottweiler	X	2	(+)	1	T2N2M1	Sarcoma anaplásico	III
7	13	Cocker Spaniel	X	3	(-)	0	T4N0-1M0	Adenocarcinoma	III
8	8	Pinscher	X	2	(-)	0	T1N0M0	Carcinoma simples	I
9	8	Pastor Alemão	X	1	(-)	0	T0N0M0	Carcinoma simples	I
10	12	Boxer	X	1	(-)	0	T0N0M0	Carcinossarcoma	II
11	9	Sem raça	X	1	(-)	0	T0N0M0	Carcinoma simples	II
12	8	Sem raça	X	2	(+)	1	T2N2M1	Carcinoma simples	I
13	5	Sem raça	X	1	(-)	0	T1N0M0	Carcinoma simples cístico	III
14	10	Poodle	X	1	(-)		T1N0M0	Carcinoma complexo	II
15	8	Sem raça	X	1	(-)		T0N0M0	Carcinoma simples	II

Legenda: X = não castrado; T = tamanho do tumor; N = metástases em linfonodo; (-) = negativo; (+) = positivo; M = metástase regional ou distante.

Fonte: Dados da pesquisa.

de 0,01 μM , 0,05 μM , 0,25 μM , 0,50 μM , 1,0 μM no crescimento de células tumorais, sendo os ensaios realizados em triplicata. Observou-se que entre as concentrações de 0,25 e 0,05 μM houve redução moderada no número de células viáveis, o que pode sugerir dose tolerância (Gráfico 1).

Não foram observadas diferenças significativas em suscetibilidade *in vitro* das amostras entre os diferentes subtipos tumorais (i. e., adenocarcinoma, carcinoma simples, carcinoma simples cístico, carcinoma complexo, carcinossarcoma, e sarcoma anaplásico).

O grupo controle também não demonstrou diferença significativa *in vitro*.

Os resultados sugerem que a prática combinada do sistema de estadiamento e determinação de concentração inibitória *in vitro* pode ser uma ferramenta diagnóstica importante para determinação prognóstica dos cânceres mamários caninos.

Discussão

Cultivo *in vitro* de tecidos tumorais é um modelo interessante para avaliar a resposta da droga e preservar algumas características *in vivo*. A maioria

das pesquisas pré-clínicas em câncer de mama é baseada no estabelecimento de linhagens celulares (BURDALL et al., 2003). Entretanto, essas linhagens de células frequentemente têm sofrido múltiplas alterações influenciadas por comportamentos biológicos que não exatamente refletem o tumor primário original. Além disso, ao tentar estabelecer a cultura primária, existe a dificuldade de adaptar as células de muitos tumores às condições *in vitro*.

O método de cultivo de tecido combinado com o sistema de cultivo de tecido confere acesso rápido da eficácia da droga. O método apresenta relevância no estudo em identificar o potencial da resposta anticâncer a drogas no complexo ambiente do tecido tumoral (VANDER KUIP et al., 2006).

As amostras tumorais foram expostas ao sulfato de vincristina em concentrações de 0,01 a 1,0 μM , próximas as doses terapêuticas em cães. Elas apresentaram padrão de concentração clínica entre (0,3 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ no soro) de cães (DIXON et al., 1969; SIMON et al., 2001). Os valores de inibição de crescimento (IC-50) observados neste estudo com o sulfato de vincristina permitiram determinar a dose dependência deste medicamento nas amostras cultivadas e a concentração apropriada em cães.

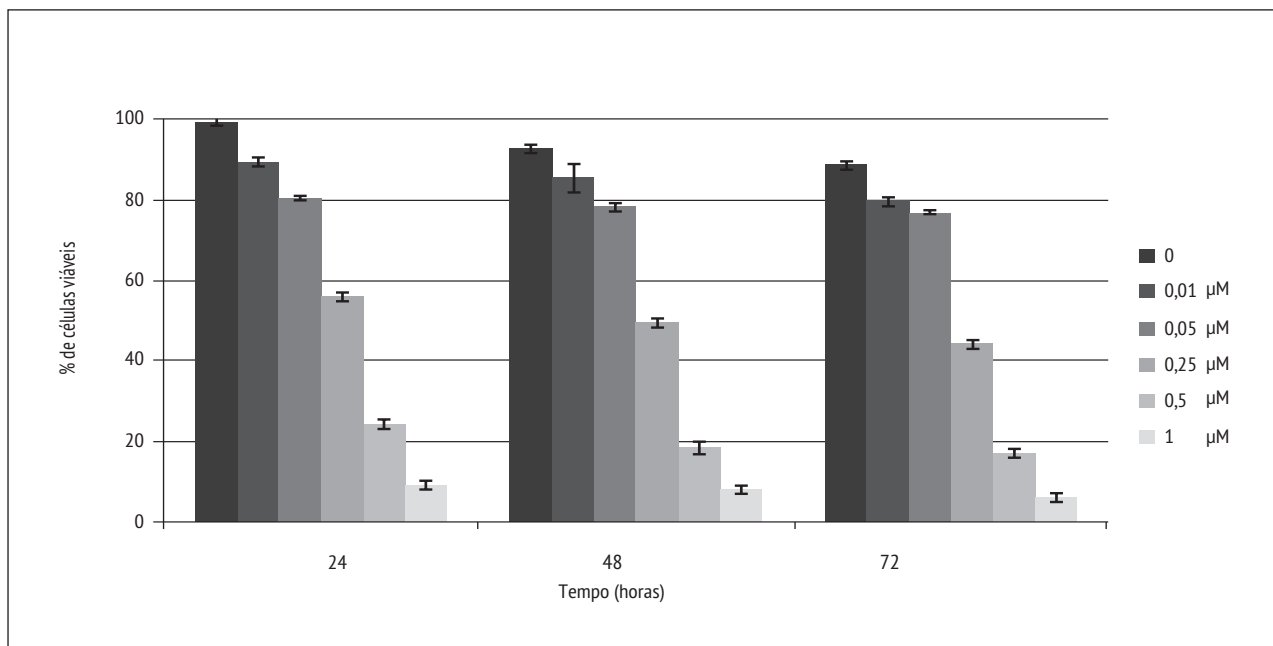


Gráfico 1 - Viabilidade do cultivo de tecido tumoral de cadelas

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: As amostras de tecidos tumorais mamários foram expostas ao sulfato de vincristina nas concentrações de 0,01 μM , 0,05 μM , 0,25 μM , 0,50 μM e 1,0 μM no crescimento de células tumorais, e os ensaios foram realizados em triplicata ($p < 0,05$).

Os tumores mamários estudados foram na sua maioria de cadelas sem raça definida, com a idade média de 9 anos de idade, o que corrobora os estudos retrospectivos (DE NARDI et al., 2002; PEREIRA et al., 2009).

Alguns resultados foram relativos e pontuais, por serem oriundos de pacientes da rotina clínica. Alguns exames não puderam ser realizados sem a autorização do proprietário. Somente em cinco animais foram realizadas radiografias torácicas para analisar a ocorrência de metástase pulmonar (38,46%), sendo necessário o exame complementar para a determinação do estadiamento correto perante o sistema tumor-nódulo-metástase (OWEN, 1980).

Seis (40%) pacientes apresentaram grau histológico I. Além disso, dois pacientes apresentaram tamanho tumoral acima de 10 cm, com características malignas e metástase em linfonodos. Dois pacientes (13,3%) com grau histológico III apresentaram metástase tumoral tanto em linfonodo e pulmão, tendo prognóstico reservado. O grau histológico também pode contribuir para baixa resposta ao medicamento. A definição do grau histológico dos tumores é uma ferramenta prognóstica importante para determinar a resposta clínica associada ao maior grau histológico como observado em pacientes com carcinoma mamário canino e humano (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

Amostras com estágios clínicos avançados apresentaram crescimento celular por causa do potencial proliferativo dos tumores malignos comparados aos benignos. Entretanto, comparação paralela entre *in vitro* e *in vivo* é necessária para se estabelecer a exata correlação da resposta à droga. Estudos moleculares serão necessários e auxiliarão na estratégia de tratamento e avaliação dos efeitos biológicos.

Conclusão

O sulfato de vincristina apresentou atividade antiproliferativa dose dependente em cultivos de tumores mamários caninos; o cultivo primário de tumor mamário canino é um modelo interessante para avaliar a resposta tumoral ao uso de medicamento. E, de forma individualizada, pode ser adaptado como método controle visando testar a eficácia da terapêutica anticâncer. Por fim, a determinação da atividade antiproliferativa *in vitro*

combinada ao estadiamento clínico pode ser uma ferramenta diagnóstica útil para o prognóstico e resposta ao tratamento do câncer mamário canino.

Agradecimentos

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Unopar e à Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (Funadesp).

Às professoras Luciana Sayuri Takemura, do Laboratório de Histopatologia; Pâmela Cristina dos Santos Sakata e Daniela dos Santos Corrêa, do Hospital Veterinário; e Mariana Ferreira de Almeida, do Laboratório de Diagnóstico por Imagem da Unopar.

Referências

- ADLAM, D. J.; DABBOUS, M. K.; WOOLEY, D. E. Electrochemical monitoring of rat mammary adenocarcinoma cells: an *in vitro* assay for anticancer drug selection. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 6, n. 6, p. 795-802, 2008. doi:10.1089/adt.2008.159.
- BURDALL, S. E. et al. Breast cancer cell lines: friend or foe? **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 2, p. 89-95, 2003. doi:10.1186/bcr577.
- CASSALI, G. D. et al. Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 4, p. 307-310, 1999. doi:10.1590/S0102-09351999000400003.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.
- CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 3, p. 325-327, 2008.
- CLEMENTE, M. et al. Survival time of dogs with inflammatory mammary cancer treated with palliative therapy alone or palliative therapy plus chemotherapy. **The Veterinary Record**, v. 165, n. 3, p. 78-81, 2009. doi:10.1136/vetrec.165.3.78.

- DALECK, C. R. et al. Aspectos clínico e cirúrgicos do tumor mamário canino: clinical and surgical evolution. **Ciência Rural**, v. 28, n. 1, p. 95-100, 1998. doi:10.1590/S0103-84781998000100016.
- DE NARDI, A. B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinários da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.
- DIXON, G. J et al. Cell culture bioassay for vincristine sulfate in sera from mice, rats, dogs, and monkeys. **Cancer Research**, v. 29, p. 1810-1813, 1969.
- ERSHLER, W. B. Explanations for reduced tumor proliferative capacity with age. **Experimental Gerontology**, v. 27, n. 5-6, p. 551-558, 1992. doi:10.1016/0531-5565(92)90009-0.
- FELICIANO, M. A. R. et al. Abordagem ultrassonográfica da neoplasia mamária em cadelas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 197-201, 2008.
- 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, 2000. doi:10.1590/S0103-8478200000400030.
- FRESHNEY, R. I. Cell lines; cloning and selection. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cell: a manual of basic techniques**. 4th. ed. EUA: Wiley-Liss, 2002. p. 187-206.
- HARVEY, A. A. R. The morphological effects of vincristine sulfate on canine bone marrow cells. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 36-41, 1993. doi:10.1111/j.1939-165X.1993.tb00601.x.
- HORTOBAGYI, G. N.; HAYES, D.; PUSZTAI, L. Integrating newer science into breast cancer prognosis and treatment: a review of current molecular predictors and profiles. **ASCO Annual Meeting Summaries**, p. 192-201, 2002.
- ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 33-38, 2004. doi:10.1016/j.jep.2003.09.014.
- KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 4, p. 246-252, 2005. doi:10.1016/j.jcpa.2005.05.003.
- KONNO, S. Potential growth inhibitory effect of maitake D-fraction on canine cancer cells. **Veterinary Therapeutics**, v. 5, n. 4, p. 263-271, 2004.
- MILTON, J. S. (Ed.). **Statistical methods in the biological and health sciences**. 2nd. ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1992.
- OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010. doi:10.1590/S0100-736X2010000200014.
- OWEN, L. N. World health organization TNM classification of tumor in domestic animals. Geneva, 1980. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. M. G. (Ed.). **Clinical Veterinary Oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Co., 1989. p. 448-489.
- PEREIRA, L. I. et al. Estudo retrospectivo das neoplasias em animais domésticos no hospital veterinário da Universidade Norte do Paraná. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - EAIC-UEL, 18., 2009, Londrina **Anais...** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2009. p. 197.
- PLIEGO, C. M. et al. Qualidade diagnóstica da biópsia com agulha Super-core II® de nódulos mamários de cadelas. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2203-2209, 2008. doi:10.1590/S0103-84782008000800018.
- QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos - novas perspectivas. In: CONGRESSO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 2002, Oeiras, Portugal. **Proceedings...** Oeiras: Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias, 10-12 out., 2002. p. 183-190.
- ROUSSEAU, A. et al. Adaptive control methods for the dose individualization of anticancer agents. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 38, n. 4, p. 315-353, 2000. doi:10.2165/00003088-200038040-00003.
- SIMON, D. et al. *In vitro* efficacy of chemotherapeutics as determined by 50% inhibitory concentrations in cell cultures of mammary gland tumors. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 11, p. 1825-30, 2001. doi:10.2460/ajvr.2001.62.1825.
- SOBRAL, R. A. et al. Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 1, p. 27, 2008. doi:10.1186/1751-0147-50-27.

VANDER KUIP, H. et al. Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact environment. **BMC Cancer**, v. 6, n. 86, p. 1-11, 2006.

WATANABE, M. et al. Tumor cell growth inhibition and cell differentiation analysis in a canine mammary tumor cell line (MCM-B2) treated with four chemical reagents. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 11, p. 1413-1417, 2009. doi:10.1292/jvms.001413.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. Clinical veterinary oncology. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. (Ed.). **Small animal clinical oncology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Co., 2007.

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Correlação entre citologia aspirativa por agulha fina e histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 38-41, 2001. doi:10.1590/S1413-95962001000100007.

Recebido: 10/08/2012

Received: 08/10/2012

Aprovado: 18/02/2013

Approved: 02/18/2013