

Ana Isabel Calado Lopes

AVALIAÇÃO DA TERMOTERAPIA FOCAL NUM MODELO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada por Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita e Professor Doutor Bruno Jorge Antunes Colaço e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Isabel Calado Lopes

Avaliação da Termoterapia Focal num Modelo de Oncologia Experimental

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas, orientada por Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita e Professor Doutor Bruno Jorge Antunes Colaço e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação* apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas.

*Este trabalho foi escrito ao abrigo do Acordo Ortográfico de 1945.

Orientadores:

Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita

Professor Doutor Bruno Jorge Antunes Colaço

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação.

(Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108, § único)

Este projecto de investigação com vista à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde foi aprovado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia para financiamento no âmbito do concurso para atribuição de bolsas de doutoramento do ano 2010, com a referência SFRH/BD/74850/2010.

O custo do estudo foi parcialmente suportado pelo financiamento atribuído pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do concurso “Projectos de Investigação Científica e de Desenvolvimento Tecnológico em Todos os Domínios Científicos, Concurso 2006” pelo projecto intitulado “TAF – Termoterapia Altamente Focalizada de tumores sólidos usando um cimento ferrimagnético injectável”, com a referência PTDC/SAU-BEB/69497/2006 sendo o investigador responsável o Doutor José Roberto Tinoco Cavalheiro.

A Associação Cognitória S. Jorge de Milréu apoiou financeiramente este projecto.

A elaboração deste trabalho decorreu em colaboração com as seguintes instituições:

- I. Universidade de Coimbra
 - a. Faculdade de Medicina - Serviço de Patologia Experimental
 - b. Centro de Química de Coimbra

- II. Universidade de Trás – os – Montes e Alto-Douro
 - a. Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV)

- III. Universidade do Porto
 - a. Instituto de Engenharia Biomédica
 - b. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Serviço de Patologia

“São precisamente as perguntas para as quais não existem resposta que marcam os limites das possibilidades humanas e que traçam as fronteiras da nossa existência.”

Milan Kundera,
in “A insustentável leveza do ser”

Ao Tó, à nossa filha Filipa e à família que viermos a aumentar

Aos meus pais, irmã e sobrinhos.

Vimos do tronco que nos deu estrutura e coragem.

À minha restante família, tios e primos.

Às minhas amigas Ana Luísa, Cinda, Teresa e Alda.

É muito bom partilharmos a viagem....

Aos meus restantes amigos.

Agradecimentos

A concretização deste objectivo académico e pessoal é, naturalmente, o resultado de um esforço individual, mas é-o igualmente pelo empenho, dedicação e honestidade intelectual de pessoas que me merecem o mais sentido e reconhecido agradecimento:

Ao Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita, pela confiança que em mim depositou desde o momento em que uma Médica Veterinária anónima lhe bateu à porta do gabinete solicitando orientação para um doutoramento. A sua simplicidade, empenho, espírito de equipa e amplitude intelectual e relacional foram uma inspiração para todo o desenvolvimento deste projecto. Foi no contacto com o Professor, e nas muitas conversas e debates que tivemos, que ampliei um leque, *a priori*, inimaginável de conceitos e visões do mundo e da medicina. É ao Professor que eu devo todo o crescimento cognitivo e espiritual destes anos. Obrigada por tudo aquilo a que me permitiu aceder.

Ao Professor Doutor Bruno Jorge Antunes Colaço, por toda a sua competência e rigor na co-orientação deste trabalho, permitindo ultrapassar as vicissitudes inerentes. Mas, mais importante ainda, foi a sua amizade, clareza de personalidade, honestidade e verticalidade. A medicina veterinária portuguesa tem muito para se orgulhar. Só poderia estar-te muito grata.

Ao Professor Doutor Alberto António Canelas Pais e à Tânia Firmino pela dedicação e ensinamentos que culminaram numa publicação conjunta.

À Professora Doutora Fátima Gärtner, que para além dos ensinamentos de patologia que me transmitiu enquanto aluna, teve sempre uma aceitação sem limites às várias solicitações que lhe enderecei.

A todos os meus professores, pelo contributo intraduzível para a minha construção profissional e pessoal que emergem neste trabalho e também os valores éticos e morais que norteiam as minhas escolhas.

À Escola Universitária Vasco da Gama, na pessoa do Professor Doutor Humberto Rocha, pelo empenho e apoio prestados.

À Associação Cognitória S. Jorge de Milréu pelo financiamento conferido, sem o qual uma grande parte desta investigação não teria sido possível.

Aos meus colegas da Escola Universitária Vasco da Gama - convosco esta caminhada teve outra cor. Prometo compensar-vos das minhas ausências.

Ao Professor Doutor José Tinoco Cavalheira e à Professora Doutora Ana Portela por todo o apoio que me deram na execução da termoterapia focal.

Ao Sr. Seco pela disponibilidade e excelência técnica que se mostraram críticas na execução de uma parte significativa deste trabalho.

À Rute, à D. Margarida, ao Gustavo e à Karen que tiveram grande relevo na fase experimental. Foram todos grandes amigos e estou-lhe muito grata por isso.

À Alexandra e à Fátima pelo brio e competência na execução de algumas técnicas laboratoriais.

Não obstante, as pessoas mais influentes em todo o meu trajecto de vida são obviamente a minha família e os meus amigos de sempre. Como tal, e em primeiro lugar, as minhas parcas palavras não poderão, de todo, exprimir a gratidão que devo aos meus pais. A formação moral e ética que me proporcionaram e o seu incondicional apoio em tantas situações pessoais e profissionais, são um exemplo de vida a seguir enquanto mãe e mulher.

Ao Tó, à nossa filha Filipa e ao novo rebento, pela família que formamos. Parece que connosco o tempo não passou e ainda agora começámos a nossa vida, há qualquer coisa que vai para além da lógica. Estarei sempre para ti assim como tens sido e estado sempre para mim. À minha filha Filipa, gerada no princípio deste projecto académico, foi e é a minha genuína força-motriz e inspiração. A mamã agradece-te a menina maravilhosa que tens sido. E agora a este novo rebentinho, que apareceu a tempo de constar neste texto, estamos todos cá para ti. A todos nós, um beijinho muito grande.

À minha irmã, pelas tantas ajudas e conselhos muito valiosos, daqueles que só os irmãos sabem dar em certas alturas. Sabes quem sou e que podes contar sempre comigo. Também ao meu cunhado e aos meus sobrinhos, “os meus filhos que vivem noutra casa”, gosto muito de vocês.

À minha amiga Ana Luísa. Ela sabe da amizade que lhe tenho e do agradecimento muito sentido pelas inúmeras e complexas situações em que o seu ombro foi de extrema importância. Minha grande amiga, obrigada por tudo!

A todos os que, mesmo de forma simples e descomprometida, contribuíram para a viabilidade e conclusão deste trabalho, enriquecendo-o com as suas sugestões, comentários e apreciações críticas.

A todos
MUITO OBRIGADA

Publicações já apresentados no decorrer desta investigação

Comunicações em Pannel:

Ana Calado, António Cabrita. *“Kidney and Vitamin D toxicity”* III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Tiradentes, Minas Gerais, Brasil 23-25 Outubro, 2013.

Ana Calado, António Cabrita. *“Heart and Vitamin D toxicity”* III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Tiradentes, Minas Gerais, Brasil, 23-25 Outubro, 2013.

Ana C. Lopes, Tânia F. G. G. Cova, Alberto A. C. C. Pais, Jorge L. G. F. S. C. Pereira, Bruno Colaço, António M. S. Cabrita. *“Improving discrimination in the grading of rat mammary tumours using low-dimensional”*, European Cancer Congress, Amesterdão, Holanda, 27 de Setembro – 01 de Outubro, 2013.

Ana Calado, Paula Pereira, Rodrigo Farinha, Silvério Cabrita. *“BALT and dietary conditioning – on a neoplastic experimental model”*. II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2012, 10-12 de Dezembro.

Ana Calado, Bruno Colaço, Ana Portela, Silvério Cabrita. *“BALT and high focalized hyperthermia. experimental study”*. II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2012, 10-12 de Dezembro.

Gonçalves, L.M.; Calado, A; Santos, M.J.; Grazina, A. *“Evaluation of gene expression in a model of experimental breast neoplasia”*. II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2012, 10-12 de Dezembro.

Ana Calado, Bruno Colaço, António Cabrita. *“Histopathological features description and its relation with grading on 148 rat DMBA-induced mammary tumours”*. Mouse models of disease – linking in vivo observations to pathology endpoints. Wellcome Trust Conference Centre, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, 1 a 3 de Fevereiro de 2012.

Ana Calado, António Cabrita. *“Histopathological description of 132 rat tumors DMBAinduced.”* I Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 10, 11 e 12 de Novembro de 2011.

Comunicações Orais em Congressos

Apresentação oral de uma palestra intitulada “*Um estudo experimental de neoplasia da mama – Hipertermia focal.*” II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Universidade de Coimbra, Portugal, 2012, 10-12 de Dezembro.

Apresentação oral de uma palestra intitulada “*Neoplasias como modelo de estudo em patologia comparada.*” I Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 10, 11 e 12 de Novembro de 2011.

Publicação de artigos em revistas internacionais indexadas

Ana C. Lopes, Tânia F.G.G. Cova, Alberto A.C.C. Pais, Jorge L.G.F.S.C. Pereira, Bruno Colaço, António M.S. Cabrita. “Improving discrimination in the grading of rat mammary tumors using two-dimensional mapping of histopathological observations”. *Experimental and Toxicologic Pathology*. Volume 66, Issue 1, January 2014, Pages 73–80.

Índice Geral

Índice Geral.....	XXV
Índice de Figuras.....	XXVII
Índice de Tabelas.....	XXXIII
Lista de Acrónimos.....	XXXV
Resumo.....	XXXVII
Abstract.....	XXXIX
Capítulo I.....	1
Introdução.....	1
Oncobiologia.....	8
Carcinogénese – características identitárias.....	16
A etiologia da carcinogénese.....	45
Diagnóstico histopatológico das neoplasias da mama e terapêuticas convencionais.....	47
Terapêuticas emergentes - Termoterapia.....	63
Alterações funcionais decorrentes da termoterapia.....	65
Hipertermia em aplicação singular e em sinergia com outras modalidades terapêuticas oncológicas.....	70
Tecnologias de aquecimento e de monitorização térmica.....	73
A vitamina D em terapia oncológica e na diferenciação osteoblástica em células neoplásicas da glândula mamária.....	78
Os modelos experimentais em investigação oncológica da mama.....	89
Capítulo II.....	95
Objectivos.....	95
Materiais e Métodos.....	99
Capítulo III.....	99
Protocolo de termoterapia focal.....	105
Protocolo de terapia complementar.....	108
Técnicas de histoquímica e métodos de avaliação.....	108
Método de imunohistoquímica.....	110
Métodos estatísticos.....	113
Capítulo IV.....	115
Resultados.....	115
1. Caracterização da glândula mamária normal.....	117
2. Caracterização do modelo experimental.....	122
2.1. Taxa de indução, curvas de crescimento e caracterização macroscópica do modelo experimental..	122
2.2. Caracterização histopatológica do modelo experimental.....	124

2.3. Caracterização do modelo experimental por histoquímica: tricrômico de Masson e azul de toluidina	131
2.4. Caracterização do modelo experimental por imunohistoquímica	132
3. Caracterização da termoterapia focal	135
3.1. Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da inoculação de cimento em animais sem indução neoplásica.....	135
3.2. Caracterização dos efeitos tecidulares da termoterapia focal em neoplasias da glândula mamária .	138
4. Caracterização da terapia complementar	144
4.1. Avaliação dos efeitos sistêmicos e tecidulares da terapia complementar em animais sem indução neoplásica.....	144
4.2. Avaliação dos efeitos sistêmicos e tecidulares da terapia complementar em animais com indução neoplásica.....	150
Capítulo V.....	157
Discussão.....	157
1. Caracterização da glândula mamária normal	159
2. Caracterização do modelo experimental.....	164
3. Caracterização da termoterapia focal	168
3.1. Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da inoculação de cimento em animais sem indução neoplásica.....	168
3.2. Caracterização dos efeitos tecidulares da termoterapia focal em neoplasias da glândula mamária .	169
4. Caracterização da terapia complementar	171
4.1. Avaliação dos efeitos sistêmicos e tecidulares da terapia complementar em animais sem indução neoplásica.....	171
4.2. Avaliação dos efeitos sistêmicos e tecidulares da terapia complementar em animais com indução neoplásica.....	173
Conclusão.....	177
Capítulo VI.....	177
Capítulo VII.....	181
Bibliografia	181

Índice de Figuras

- Figura 1 – Modelo simplificado da hierarquia celular e da diferenciação na glândula mamária normal em humanos. (A) Células estaminais dão origem a células luminais e mioepiteliais numa linhagem sequencial de diferenciação ainda mal definida. (B) Representação de uma unidade lobular do ducto terminal com uma distribuição das células estaminais e diferenciadas indicadas em (A). A linha cinzenta representa a membrana basal. CK14, citoqueratina 14; MUC1, mucina 1. Adaptado de Poliak, 2007 [54]. 9
- Figura 2 – Representação esquemática da variabilidade celular intra e intertumoral. Semelhanças moleculares permitem o agrupamento dos tumores de mama nos subtipos luminal, onde predominam as células epiteliais mais bem diferenciadas, e no sub-tipo basal, onde predominam as células com menor diferenciação, no entanto, a heterogeneidade celular existe dentro de cada subtipo tumoral. O subtipo HER+ não está representado na figura. Adaptado de Poliak, 2011 [56]. 10
- Figura 3 – Modelos de formação tumoral. (A) Modelo estocástico de oncogénese. Células estaminais no topo de uma hierarquia celular normal originam células progenitoras que se multiplicam e diferenciam em células maduras bem diferenciadas. Neste modelo qualquer célula pode acumular mutações genéticas e dar origem à neoplasia, independentemente do seu estado de diferenciação inicial. (B) No modelo das células estaminais do cancro apenas estas podem gerar tumores dada a sua capacidade de auto-renovação e proliferação sustentada. Considera-se ainda que as células estaminais do cancro têm origem em células estaminais normais mutadas que, por multiplicação, dão origem a um conjunto heterogéneo de células progenitoras e células maduras. Adaptado de Pang, 2010 [58]. 11
- Figura 4 – Modelos hipotéticos que explicam os subtipos tumorais referenciados na glândula mamária em humanos. (A) No modelo de expansão clonal os diversos subtipos tumorais têm origem em diferentes tipos celulares, presumivelmente em células estaminais ou em células progenitoras. (B) No modelo das células estaminais do cancro, a célula de origem pode ser a mesma para diferentes subtipos tumorais e o fenótipo é determinado pelos acontecimentos genéticos e epigenéticos. Adaptado de [54]. 12
- Figura 5 – A célula de origem de uma célula estaminal do cancro e a sua evolução. A célula de origem do tumor, aquela que é iniciada, pode ser distinta da CSC, que propaga o tumor. Neste modelo, apenas as CSC detêm a capacidade de tumorigénese sustentada. A hierarquia celular normal compreende células estaminais que progressivamente geram células progenitoras/percussoras de todos os tipos celulares constituintes de um tecido. A expansão de uma célula progenitora iniciada pode originar CSCs e diversas células maduras bem diferenciadas. Adaptado de Visvader, 2011 [57]. 12
- Figura 6 – Características biológicas de células malignas. (A) Histopatologia de um carcinoma espinocelular. HE (B) Imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA. (C) Imunohistoquímica com anticorpo anti-p53. (D) Citologia por raspagem de carcinoma dérmico. Coloração de Papanicolaou. Barra de escala de 50 µm (A e C) e 20 µm (D). HE, hematoxilina e eosina; PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*. Adaptado de Tanaka, 2013 [49]. 13
- Figura 7 – Desdiferenciação e atipia de células normais, pré-neoplásicas e neoplásicas. A evolução da carcinogénese relaciona-se com a diminuição da diferenciação e com o aumento da atipia nuclear e aumento do número de mitoses, incluindo mitoses anormais. Figuras de mitose simétrica, entendida como normal, assimétrica ou anormal (e.g. assimétrica tripolar). Adaptado de Tanaka, 2013 [49]. 14
- Figura 8 – Carcinogénese química como o paradigma da oncogénese: iniciação, promoção e progressão. Adaptado de Tanaka, 2013 [49]. 15
- Figura 9 – As características identitárias das neoplasias e a progressão do fenótipo estaminal dos tumores. As mutações em genes críticos na aquisição de fenótipos malignos dão origem a clones com vantagens sucessivas até à selecção de células estaminais dos tumores. Adaptado de Badve, 2012 [68]. 17
- Figura 10 - Silenciamento de genes em células normais. O silenciamento de genes entre divisões celulares inclui, entre outros, a metilação do DNA, as modificações covalentes das histonas e a remodelação dos nucleossomas importantes para o desenvolvimento e diferenciação das células e tecidos. DNMT, *DNA methyltransferase*; HDAC, *histone deacetylase*; HMT, *histone methyltransferase*; NURFs, *nucleosome remodeling factors*. Adaptado de Jones, 2007 [78]. 18
- Figura 11 – Estrutura alterada do núcleo e da epigenómica das células neoplásicas. Núcleo normal: zonas activas (amarelo) e inactivas (cinzento), lâmina nuclear (círculo azul), regiões hipermetiladas inactivas (círculos pretos), nucleossomas com marcas repressivas nas histonas (cilindros vermelhos), factores de transcrição (formas verdes), genes activos (linhas vermelhas), genes não metilados (círculos brancos), histonas com marcos positivos (cilindros verdes). Núcleo neoplásico: desmetilação global do DNA (círculos brancos), gene silenciado por metilação do promotor CpG (linhas azuis com círculos pretos), factores de transcrição específicos (formas vermelhas). Adaptado de Hassler, 2012 [77]. 19
- Figura 12 – As funções da p53 na manutenção da integridade do genoma. A activação da p53 normal por agentes genotóxicos ou por hipóxia induz a paragem do ciclo celular em G1 e a reparação do DNA por aumento de inibidores das cinases dependentes da ciclina como o p21. A reparação bem-sucedida do DNA permite que a célula retome o ciclo celular com normalidade. Se a reparação do DNA falhar o p53 activa a apoptose ou o estado de senescência. Nas células com mutação do p53 não há activação da paragem do ciclo celular em G1 e a reparação mal sucedida do DNA permite que a célula continue a proliferar com alterações do genoma, dando origem a eventuais neoplasias. Adaptado de Stricker, 2013 [47]. 24
- Figura 13 – No ácino mamário as células centrais em *stress* perdem uniões intercelulares e matriciais. Uma vez no lúmen, estas células entram em anoiquia, autofagia, entose ou necrose programada – necroptose. Adaptado de White, 2007 [107]. 27
- Figura 14 – Representação esquemática da apoptose. A apoptose é desencadeada pelas vias extrínseca e intrínseca, mas também pela via perforina/granzima. Cada via activa uma caspase específica, respectivamente, caspases 8, 9 e 10, seguindo-se a activação da caspase 3. As características citomorfológicas da apoptose são a diminuição do volume celular, a condensação da cromatina, a formação de vesículas citoplasmáticas e corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas adjacentes e células neoplásicas. Adaptado de Elmore, 2007 [109]. 28

- Figura 15 – A participação da apoptose, autofagia e necrose na oncogénese. a) As mutações da iniciação tumoral promovem a proliferação e a apoptose, o que limita a progressão activa de oncogenes, até que lesões genotóxicas adicionais inibam a apoptose e permitam o crescimento tumoral. b) O crescimento inicial do tumor sem perfusão sanguínea desencadeia hipóxia nas células centrais, autofagia e um estado de latência até que a angiogénese possibilite a retoma do pleno estado metabólico e o crescimento das células. c) Em tumores com alteração das vias de apoptose e autofagia, as células em *stress* metabólico entram em necrose com desencadeamento de inflamação, instabilidade genómica e angiogénese, favorecedoras do crescimento tumoral. Adaptado de [113]..... 29
- Figura 16 – O metabolismo do cancro e a autofagia. Os produtos da autofagia estão relacionados com a reprogramação metabólica. Os aminoácidos e carboidratos reciclados são usados na glicólise aeróbia e na via das pentoses (pentose phosphate pathway, PPP). A autofagia fica aumentada na presença de *stress* celular, ROS e hipóxia e torna-se diminuída quando a célula tem quantidades adequadas de nutrientes e factores de crescimento, o que forma um ciclo contínuo. Adaptado de [114]. 30
- Figura 17 – A evolução da autofagia. Após a sua indução, o processo autofágico pode evoluir para apoptose ou para a sobrevivência da célula através da reactivação do ciclo celular. Adaptado de Guadamillas, 2011 [112]. 31
- Figura 18 – A transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) no programa de resistência à anoiquia. Em tecidos epiteliais não-neoplásicos, as células que se desprendem da matriz, anoiquia, entram em apoptose. As células neoplásicas que passam pela EMT libertam-se das adesões intercelulares e podem assim resistir à anoiquia e metastizar. Adaptado de Frisch, 2013 [122]. 32
- Figura 19 – A entose e a dupla evolução em morte celular ou sobrevivência. Quando uma célula epitelial se destaca da sua matriz, em vez de anoiquia, pode passar pelo processo de entose que é favorecido por forças associadas às junções de aderência. Neste estado intermediário, onde uma célula fica internalizada noutra célula, pode haver a sua eliminação por degradação lisossomal ou pode manter-se viável até à libertação e retorno da actividade com ancoragem na matriz conjuntiva. [112]. 33
- Figura 20 – A dormência tumoral versus eliminação tumoral é regulada pelo sistema imunitário funcional do hospedeiro. Adaptado de Bellocin, 2013 [123]. 33
- Figura 21 – As consequências da inflamação aguda e da inflamação crónica na biologia dos tumores. Na inflamação aguda, os LTh1 produzem citocinas antitumorais que, em combinação com a acção humoral dos LB, recrutam LT citotóxicos e contribuem para a rejeição do tumor. Na inflamação crónica os LTh2, os LB activados e os LTreg libertam factores favorecedores do crescimento como o TGF- β , aumentam a resposta imune inata e inactivam os LT citotóxicos, favorecendo o crescimento tumoral. Adaptado de DeNardo, 2007 [129]. 34
- Figura 22 – A inflamação no desencadeamento da iniciação tumoral e na sua promoção. A) Iniciação tumoral. As espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*, ROS) e as espécies intermediárias de nitrogénio (*reactive nitrogen intermediates*, RNI) causam mutações nas células adjacentes. Em células iniciadas as citocinas aumentam muito os níveis de ROS e RNI com agravamento da genotoxicidade e de epimutações. B) A promoção tumoral. Em células pré-malignas, as citocinas produzidas por células imunitárias infiltradas nos tumores activam factores de transcrição importantes como NF- κ B ou STAT3 com efeito vantajoso na sobrevivência, proliferação, crescimento e invasão e geram um ciclo inflamatório auto-sustentado. Adaptado de Grivennikov [128]. 35
- Figura 23 – Abordagem ilustrada das complexas sinalizações e alterações induzidas por mastócitos em tumores. As células tumorais produzem o factor de células estaminais (*stem cell factor*, SCF), atractivo para mastócitos que, por sua vez, produzem diversos factores angiogénicos e metaloproteinases da matriz, como a MMP-2, promovendo vascularização tumoral e a invasão, respectivamente. Os mastócitos podem ainda gerar imunossupressão pela libertação de IL-10, histamina e factor de necrose tumoral- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) e, por outro lado, activar os linfócitos T reguladores que medeiam a imunotolerância e a promoção tumoral. Em oposição, os mastócitos podem promover inflamação e inibição do crescimento tumoral e apoptose das células neoplásicas pela libertação de quimase e interleucinas e citoquinas relevantes, como o TNF- α . Adaptado de Ribatti, 2012 [135]. 38
- Figura 24 – Os factores de crescimento e as etapas da oncogénese. A célula mutada ou iniciada (1) expande-se (2) pela influência do EGF e IGF1 originando lesões intraluminais *in situ* (3). A fase de invasão (4) tumoral é influenciada por oncogenes, genes supressores tumorais e muitos factores de crescimento. A disseminação (5) associada à intravasão e extravasão das células neoplásicas em vasos sanguíneos e linfáticos forma micrometástases (6) e a aquisição de novas mutações produtoras de vias autócrinas de crescimento produzindo clones resistentes (7). A angiogénese (8) sustenta o crescimento das células e a formação de uma grande metástase (9). CSF-1, *colony stimulating factor 1*; EGF, *epidermal growth factor*; FGF, *fibroblasts growth factor*; HB-EGF, *heparin-binding EGF*; IGF1, *insulin growth factor*, NRG, *neuregulin*; TGF, *transforming growth factor*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. Adaptado de Witsch, 2010 [94]. 39
- Figura 25 – Os diferentes tipos de transição epitélio-mesenquimatosa. (A) O tipo 1, está associado com a embriogénese. O epitélio primitivo origina o mesenquima primitivo e células bem diferenciadas do tecido conjuntivo como condrócitos, osteoblastos e mioblastos. (B) O tipo 2 está presente na inflamação e fibrose. (C) O tipo 3 ocorre em células epiteliais neoplásicas que, pela transição epitélio-mesenquimatosa, adquirem a capacidade de invadir e metastizar. Adaptado de Kalluri, 2009 [145]. 40
- Figura 26 – Durante a transição epitélio-mesenquimatosa (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT), as células epiteliais perdem muitas características específicas dos epitélios e adquirem fenótipos típicos de células mesenquimatosas. (A) e (B) Repressores da transcrição da E-caderina diminuem esta molécula de adesão entre células epiteliais, sendo este um evento-chave da EMT. A localização da β -catenina transfere-se do complexo membranar com a E-caderina para o citoplasma e depois para o núcleo onde activa os genes relacionados com o fenótipo mesenquimatoso como a α -actina de músculo liso e vimentina. (C) e (D) Como resultado das alterações decorrentes da EMT as células epiteliais são libertadas dos tecidos envolventes e podem tornar-se migratórias e invasivas. Adaptado de McCormack, 2013 [144]. 41
- Figura 27 – As etapas de metastização de um tumor mamário incluem (1) a formação do tumor primário, (2) invasão local, (3) intravasão, (4) transporte na circulação, (5) aprisionamento nos capilares, (6) extravasão, (7) micrometástases e (8) macrometástases. A resistência à anoiquia é causada por instabilidade genética, hipóxia intratumoral, activação de transição epitélio-mesenquimatosa

e expressão de marcadores estaminais, podendo estar implicada no processo de metastização. Adaptado de Paoli, 2013 e Buchheit, 2012 [92] e [108].	42
Figura 28 – A plasticidade entre a transição epitélio-mesenquimatosa (<i>epithelial-mesenchymal transition</i> , EMT) e a transição mesenquimo-epitelial (<i>mesenchymal-epithelial transition</i> , MET) no processo de metastização. Adaptado de, Pang, 2010 [58].	43
Figura 29 – (A) Histologia de glândula mamária humana onde se destacam os lóbulos e os ductos intercalares. HE, 40x. (B) Imunohistoquímica para K14 no epitélio normal de mama humana. Neste segmento observa-se que as células mioepiteliais dos ductos interlobulares são positivas (castanho) e a maioria das células mioepiteliais dos lóbulos são negativas para este marcador (100x). Adaptado de santagata, 2014 [55].	48
Figura 30 – Possível árvore filogenética de diferenciação dos subtipos epiteliais da mama normal. As células positivas para receptores hormonais (HR+) têm uma célula progenitora comum, diferente da célula progenitora das células que são positivas para K5 e das células mioepiteliais (M1-2). A célula progenitora comum dos três grupos, HR+, K5+ e M1-2, parece ser uma célula Ki67/K18+ e HR/K5/SMA- consistente com um fenótipo proliferativo. Adaptado de Santagata, 2014 [55].	49
Figura 31 – Proposta de hierarquia celular na glândula mamária de murganho (M) e de humanos (H). As células estaminais auto-renovam-se ou diferenciam-se, durante a embriogénese, em células luminiais progenitoras ou em células mioepiteliais. Estímulos ambientais permitem que a população progenitora se diferencie em célula ductal, ER positivo e PR positivo, ou em célula alveolar secretora de leite durante a gestação. ALDH, aldeído desidrogenase; EpCAM, <i>epithelial cell adhesion molecule</i> ; ER, <i>estrogen receptor</i> PR, <i>progesterone receptor</i> . Adaptado de Shehata, 2012 [180].	50
Figura 32 – Representação esquemática de um rebento terminal (<i>terminal end bud</i> , TEB) e ducto primário. Notar o epitélio estratificado do TEB formado por uma camada externa de células estaminais em elevado índice mitótico que forma as restantes camadas também em proliferação. A membrana basal é muito escassa na extremidade infiltrativa do tecido adiposo. O colar de estroma é rico em fibroblastos com presença de eosinófilos (representados a vermelho) e macrófagos (representados a azul). Formação de uma nova ramificação a partir do ducto primário (seta fechada). Adaptado de Sternlicht, 2006 [192].	51
Figura 33 – Representação esquemática da quarta glândula mamária abdominal numa fêmea virgem de rato com 55 dias de idade. A glândula divide-se em três zonas. A zona A, proximal ao mamilo (n), contém numerosos lóbulos primários (lob). A zona B, medial, engloba o gânglio linfático. A zona C, distal ao mamilo, contém a maioria dos TEBs em crescimento activo, rebentos alveolares e ductos terminais. AB, <i>alveolar buds</i> ; TD, <i>terminal ducts</i> , TEB, <i>terminal end bud</i> . Adaptado de Russo, 1996 [138].	52
Figura 34 – História da hipertermia em oncologia. Adaptado de Szasz, 2014 [238].	64
Figura 35 – A elevação da temperatura e os efeitos anti-tumorais directos e indirectos. Acima da temperatura normal em humanos, 37°C, a elevação térmica até ao limite sub-letal de 43°C, induz a expressão de HSPs. No intervalo hipertérmico, 41-43°C, ocorre um aumento do afluxo sanguíneo, o que é sinérgico com a quimioterapia e a radioterapia, e também alterações fisiológicas que, indirectamente, levam à eliminação das células neoplásicas. A partir dos 43°C, a apoptose e a necrose são os factores que directamente contribuem para a destruição tumoral. HSPs, <i>Heat shock proteins</i> . Adaptado de Issels, 2008 [260].	66
Figura 36 – Formação de complexos formados por HSPs e antigénios tumorais em condições de hipertermia. O calor leva à abertura de antigénios purificados com exposição de resíduos hidrofóbicos capazes de se ligar a HSPs. HSPs, <i>Heat shock proteins</i> . Adaptado de Segal, 2006 [263].	67
Figura 37 – As HSPs aumentam a apresentação de antigénios e a actividade das células NK com conseqüente lise das células neoplásicas. As HSPs são induzidas em situações de <i>stress</i> fisiológico, como febre e necrose celular, e activam as APCs necessárias para a iniciação de resposta imunitária primária e secundária. A actividade dos linfócitos T citotóxicos específicos de antigénio é iniciada causando a apoptose da célula. As células NK destroem directamente as células tumorais e aumentam a actividade das CTLs. APCs, <i>Antigen presenting cells</i> ; CTL, <i>Cytotoxic T lymphocyte</i> ; HSPs, <i>Heat shock protein</i> ; NK, <i>Natural killer</i> . Adaptado de Segal, 2006 [263].	68
Figura 38 – Mecanismo de sobreaquecimento tumoral. O aquecimento aplicado a tecidos normais causa a dilatação dos vasos sanguíneos de modo a diminuir a temperatura dos tecidos. Em tecidos tumorais os vasos sanguíneos são tortuosos e não dilatam, alguns colapsam, e o calor não é evadido pelo efluxo, o que aumenta selectivamente a temperatura na geometria tumoral. Adaptado de Chichet, 2007 [245].	70
Figura 39 – Relação dose-efeito da morte celular por hipertermia. Desenho esquemático da fracção de sobrevivência de células assíncronas de ovário de hamster aquecidas a diferentes temperaturas, com ênfase no “ombro” típico aos 42°C. Adaptado de Hildebrandt, 2002 [262].	75
Figura 40 – Desvantagens da hipertermia clássica. a.) A disseminação do calor ocorre no foco da deposição de energia. b.) O aumento do afluxo local de sangue aumenta a disponibilidade de nutrientes ao tumor. c.) Há um aumento do risco de disseminação de metastização. Adaptado de Szasz, 2014 [238].	77
Figura 41 – Síntese da vitamina D em pele, de humanos e de animais, quando exposta a raios ultravioleta B. Nestas condições, o calciferol é sintetizado a partir de 7-deidrocolesterol. A síntese envolve as hidroxilações 25 e 1 α da vitamina D ₂ e D ₃ , no fígado e no rim, respectivamente, formando a 1,25(OH) ₂ D ou calcitriol. Adaptado de Vuolo, 2012 [313].	78
Figura 42 – Esquematisação dos mecanismos moleculares de acção do calcitriol. A activação do receptor da vitamina D (<i>vitamin D receptor</i> , VDR), localizado no núcleo, ocorre por ligação com 1,25D ₃ formando um heterodímero com o receptor retinóide X. O dímero VDR/RXR associa-se ao elemento responsivo ao receptor da vitamina D, (<i>Vitamin D receptor response element</i> , VDRE) e recruta vários complexos co-reguladores no promotor do gene alvo. Dão-se então alterações epigenéticas e remodelação da cromatina que resultam na activação da expressão génica. Adaptado de Kouzmenko, 2011 [325].	80
Figura 43 – A 1,25(OH) ₂ D tem efeitos fisiológicos pela via genómica, mediada pelo receptor nuclear e pela via não-genómica, através de mecanismos iniciados na membrana plasmática. A 1,25(OH) ₂ interage com o receptor da vitamina D (<i>vitamin D receptor</i> , VDR) localizado no núcleo onde desencadeia efeitos genómicos ou, por outro lado, na caveola da membrana plasmática onde desencadeia respostas rápidas não-genómicas. A 1,25(OH) ₂ D interage directamente com o ligando esteróide de respostas rápidas	

- associado a membranas (*membrane-associated, rapid response steroid-binding*, MARSS) com activação de segundos mensageiros, incluindo a fosfolipase C, a proteína cinase C (PKC), receptores ligados à proteína G ou a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). Os resultados possíveis desta via membranar incluem a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem ou canais de cloro ou geração de segundos mensageiros. Alguns destes segundos mensageiros, em particular RAF/MAPK, por trans-activação do VDR, podem regular da expressão génica. Adaptado de Vuolo, 2012 [313]...... 81
- Figura 44 – A expressão de VDR e de CYP27B1 diminui com a carcinogénese mamária, enquanto a expressão de CYP24A1 aumenta com os fenótipos mais invasivos. Adaptado de Lopes, 2012 [316]...... 82
- Figura 45 – Esquematização dos efeitos potenciais da vitamina D no desenvolvimento e progressão de carcinomas. A 25(OH)D circulante pode ser um substrato para a produção local de 1,25(OH)₂D pela CYP27B1 em múltiplos tipos celulares. Esta forma activa de vitamina D modifica a transcrição de genes, pela ligação com o VDR. A enzima CYP24 é induzida pelo VDR e metaboliza a 1,25(OH)₂D em ácido calcitroico com limitação da concentração da vitamina D activa na célula. A activação do VDR pode alterar genes que contribuem para a paragem do ciclo celular, estimulação da diferenciação, inibição da apoptose, inibição da angiogénese e inibição da degradação da matriz. Adaptado de Hendy, 2011 [332]...... 83
- Figura 46 – Modelo de transformação mesenquimatosa e deposição de cálcio em tumores de mama. A mineralização fisiológica envolve células mesenquimatosas que expressam vimentina e β-catenina nuclear/citoplasmática. Num ambiente condicionado por β-2 microglobulina as células epiteliais adquirem um fenótipo com características mesenquimatosas, podendo assumir um fenótipo osteoblástico com produção de formas complexas de calcificação. Adaptado de Scimeca, 2014 [340]...... 86
- Figura 47 – Evolução histórica da utilização dos murganhos desde o estudo dos tumores espontâneos até aos transgénicos da actualidade. *Genetic engineered mice* (GEM). Adaptado de Cardiff, 2011 [351]...... 89
- Figura 48 – Rato da estirpe Sprague-Dawley. Marcação numérica das glândulas mamárias. 103
- Figura 49 – Preparação do cimento ferrimagnético para inoculação intratumoral. A) Pesagem de 1g de cimento em pó numa base de vidro em balança de precisão centesimal. B) Adição de água destilada estéril para obtenção de uma pasta com volume aproximado de 1ml. C) Introdução da pasta de cimento numa seringa de 5ml. 105
- Figura 50 – Inoculação do cimento e monitorização da distribuição espacial dentro do tumor através de radiografia. A) Inoculação do cimento através de agulha de 16 gauge no centro do volume tumoral palpado. B) Radiografia em projecção lateral do tumor inoculado. Imagem original. 106
- Figura 51 – Adaptador de bobina para hipertermia em rato. O animal é colocado na vertical tendo um apoio regulável para a cabeça na porção inferior do tubo. A região tumoral de interesse fica ao nível da maior abertura. 106
- Figura 52 – Tratamento hipertérmico com monitorização por câmara de termografia. 107
- Figura 53 – Produtos comerciais utilizados no método comercial com polímero enzimático, A. Câmara húmida com preparações em fase de aplicação do anticorpo primário do processo de marcação por imunohistoquímica. 111
- Figura 54 – Imagem histológica da glândula mamária inguinal direita num rato fêmea virgem da estirpe Sprague Dawley com 34 semanas de idade. A) A glândula mamária é formada por estruturas tubuloalveolares dispersas por uma almofada lipídica (HE, 50x). B) As células luminais (seta preta) e as células mioepiteliais (seta azul) formam o parênquima e o estroma é formado por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Há ocorrência de pigmentação dourada (círculo vermelho) no citoplasma de células luminais alveolares (HE, 400x). C) Evidenciação positiva do pigmento dourado pelo corante Azul da prússia (AP), (AP, 400x). D) Evidenciação negativa da pigmentação com Ziehl Neelsen (ZN) (ZN, 400x). E) Coloração selectiva das fibras de colagénio por tricrómico de Masson, (TM, 100x). F) Metacromasia dos grânulos de mastócitos (destaque circular) pela coloração Azul de toluidina (AT), (AT, 400x) 119
- Figura 55 – Caracterização da glândula normal do rato por imunohistoquímica. A) Imunomarcação das células luminais por estrogénio (400x); B) Imunomarcação pouco expressiva da osteopontina periglandular (200x); C) As células basais dos túbulos são fortemente positivas para HSP70 (200x) assim como em D) as células basais dos alvéolos mamários (400x). 121
- Figura 56 – Proliferações neoplásicas nas glândulas mamárias à 27ª semana após a indução carcinogénica com 65mg/Kg de DMBA. As neoplasias desenvolvem-se nas glândulas mamárias cervicais e torácicas (círculos vermelhos) e nas glândulas mamárias abdominais e inguinais (círculos verdes). 122
- Figura 57 – Fotomicrografias de neoplasias da glândula mamária do grupo II com representação de alguns padrões estruturais presentes nos tumores da glândula mamária de ratos com carcinogénese induzida por DMBA: A) adenoma de lactação com secreção de nível 3 (HE, 200x); B) padrão tubular com secreção (asterisco) de nível 2 (HE, 100x); C) padrão papilar com secreção de nível 1 (HE, 100x); D) padrão sólido (círculo preto) e padrão com necrose numa aparência de comedocarcinoma (círculo vermelho), com secreção de nível 0 (HE, 200x); E) padrão cribriforme envolvido por estroma infiltrado por células inflamatórias de nível 2 (HE, 200x); e F) padrão espinocelular com formação de queratina, ortoplásico (HE, 40x). 124
- Figura 58 – Fotomicrografias de neoplasias de glândula mamária do grupo II com células neoplásicas onde os núcleos podem ser classificados como I, II ou III. A) Grau nuclear I, notar a disposição basal dos núcleos e a regularidade do tamanho, forma e padrão de cromatina das células epiteliais de um adenoma de lactação. Dois corpos amiláceos estão assinalados com um círculo (HE, 200x); B) grau nuclear I, notar a homogeneidade entre as células epiteliais que formam ductos e alvéolos neste carcinoma tubular muito semelhantes com as células epiteliais não neoplásicas da glândula mamária (HE, 100x); C) grau nuclear II, observar alguma homogeneidade nuclear em tamanho e padrão de cromatina, apesar do pleomorfismo moderado quanto à forma dos núcleos que variam de redondos a ovais (HE, 400x); D) grau nuclear II, os núcleos das células neoplásicas conservam uma relativa homogeneidade quanto à forma e tamanho, apesar de serem constituídos por cromatina de padrão reticular (HE, 400x); E) grau nuclear III, os núcleos apresentam um pleomorfismo acentuado e vesículas intranucleares (setas), notar ainda figuras de mitose em metafase (círculo) e anafase (forma oval) (HE, 400x); F) duas mitoses assimétricas, ditas aberrantes, numa população celular com grau nuclear III (HE, 400x). 125

- Figura 59 – Fotomicrografias de neoplasias da glândula mamária do grupo II onde se observam algumas características avaliadas por semiquantificação. A) Focos de microcalcificação intraluminal (setas) (HE, 100x). B) Infiltração tumoral por eritrócitos extravasculares, hemorragia de nível 3 (HE, 100x). C) Adenocarcinoma papilar com desmoplasia de nível 2 (HE, 100x). D) Adenocarcinoma tubular com desmoplasia de nível 3 (HE, 100x). E) Invasão do estroma peritumoral por um grupo de células neoplásicas (HE, 400x). F) Invasão do estroma peritumoral por células neoplásicas individualizadas (HE, 200x). G) Células individualizadas em anoiquia com pigmentação intracitoplasmática dourada e acastanhada compatível com ferro e ceróide, respectivamente (HE, 200x). H) Necrose tumoral de nível 3 com fendas de colesterol (setas) (HE, 200x). 126
- Figura 60 – Histogramas de frequência normalizada para a projecção de tumores de acordo com o grau tumoral. Os histogramas a verde referem-se aos tumores de grau 1, a amarelo e vermelho correspondem os de grau 2 e 3, respectivamente. 130
- Figura 61 – O tecido conjuntivo nas neoplasias da glândula mamária de rato induzidas por DMBA. A intensidade de tecido conjuntivo é variada e heterogénea. A) Adenocarcinoma papilar e cribriforme com escasso tecido conjuntivo (HE, 100x); B) coloração selectiva com TM para tecido conjuntivo, semiquantificado em nível 1 (TM, 100x); (C) Ainda no mesmo tumor, verifica-se uma infiltração de mastócitos (AT, 100x). D) Comedocarcinoma com estroma formado por tecido conjuntivo em quantidade moderada (HE, 50x); E) tecido conjuntivo evidenciado com TM e semiquantificado em nível 2 (TM, 50x); F) comedocarcinoma com infiltração de mastócitos (AT, 50x). G) Adenocarcinoma cribriforme e tubular com intensa quantidade de tecido conjuntivo (HE, 100x); H) tecido conjuntivo evidenciado com TM e semiquantificado em nível 3 (TM, 100 x); I) tecido conjuntivo com infiltração de mastócitos (AT, 100x). 131
- Figura 62 – Imunomarcação neoplasias mamárias induzidas por DMBA. A) Adenocarcinoma sólido com forte positividade ao receptor de estrogénio, (200x). B) Carcinoma sólido com células imunomarcadas por anticorpo anti-Ki67, (400x). C) Identificação de células em apoptose por imunomarcação de caspase 3, (200x), D) Adenocarcinoma sólido muito heterogéneo na imunomarcação pelo anticorpo anti-HSP70, (50x) e pormenor das células parenquimatosas positivas, (400x). E) e F) Evidenciação de linfócitos T, CD3+, presentes no estroma e no parênquima, respectivamente, (400x e 200x). G) e H) Imunomarcação de osteopontina com intensidade 1 e intensidade 2, respectivamente, (200x). 134
- Figura 63 - Corte histopatológico de glândula mamária inoculada pelo biomaterial ferrimagnético. A) Tecido cicatricial imaturo com fibrina envolvida em cimento seguida de uma camada mais espessa de tecido de granulação (HE, 100x). B) Cápsula conjuntiva formada por tecido conjuntivo jovem (TM, 100x) 136
- Figura 64 – Imunomarcação de cápsula conjuntiva circundante ao biomaterial inoculado no grupo III pelo anticorpo anti-CD3, (200x). 137
- Figura 65 – Neoplasia mamária do grupo Vt onde se observa necrose muito ligeira (A) (HE, 100 x), moderada (C (HE, 100 x) e intensa (E) nos tecidos adjacentes ao cimento (biomaterial negro no tecido) após tratamento hipertérmico (HE, 100 x). O tecido conjuntivo é muito desenvolvido na maioria das neoplasias. Em B) pode observar-se a infiltração de tecido conjuntivo no parênquima tumoral semiquantificado em nível 2 (HE, 100x), em D) o tecido conjuntivo está selectivamente corado, (TM, 100x) e em F) observa-se grande infiltração de mastócitos ao longo das fibras conjuntivas, (AT, 100x). G) Presença muito acentuada de tecido conjuntivo, (HE, 50x) e H) Tecido conjuntivo semiquantificado em nível 3 (TM, 50x). 139
- Figura 66 – Caracterização molecular por imunohistoquímica em tumores tratados por hipertermia focal. A) Imunomarcação nuclear dos receptores de estrogénio (x100). B) Marcação de células em proliferação pelo anticorpo anti-Ki67 (200x). C) Identificação de células em apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 (200x). D) Imunomarcação de linfócitos T no estroma e no parênquima de uma neoplasia mamária tratada pelo anticorpo anti- CD3 (200x) e pormenor da distribuição ampla dos linfócitos pelo tumor (400x). E) Imunomarcação celular pelo anticorpo anti-HSP70 com intensidade moderada, nível 2 (100x) e pormenor que destaca a marcação das células epiteliais neoplásicas numa área sólida (400x). F) Imunomarcação celular pelo anticorpo anti-HSP70 com intensidade de nível 3 (50x) e pormenor que destaca a marcação das células epiteliais neoplásicas numa área de padrão papilar (200x). 141
- Figura 67 – Caracterização molecular por imunohistoquímica em tumores não-tratados por hipertermia focal provenientes de animais tratados. A) Marcação de células em proliferação pelo anticorpo anti-Ki67 (200x). B) Identificação de células em apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 com imunomarcação de intensidade ligeira (400x). C) Imunomarcação celular pelo anticorpo anti-HSP70 com intensidade moderada e forte, níveis 2 e 3, respectivamente (200x). D) Imunomarcação de linfócitos T no estroma, lado esquerdo, e no parênquima, lado direito, de uma neoplasia mamária marcada pelo anticorpo anti-CD3 (200x). 143
- Figura 68 – Glândula mamária de um animal com protocolo de terapia complementar. A) Sub-grupo com administração de coledalciferol onde se observa o estroma mamário (HE,100x). B) Tecido conjuntivo de (A) evidenciado por tricrómico de Masson e nivelado em moderado ou 2 (TM, 100x). C) Glândula mamária de um animal com protocolo de terapia complementar com administração de coledalciferol e dexametasona onde se observa o estroma mamário (HE, 100x). D) Evidenciação do tecido conjuntivo de C) por TM, nivelado em forte ou 3 (TM, 100x). E) e F) Glândula mamária do grupo IVa em HE e AT, respectivamente, com evidenciação metacromática de escassos mastócitos, (HE, 100x e AT, 200x) 147
- Figura 69 – Glândula mamária do grupo IV com imunomarcação pelo anticorpo anti-CD3 que marca os linfócitos T. Notar a distribuição parenquimatosa destas células imunitárias, (200x). 149
- Figura 70 – Histopatologia das neoplasias mamárias do grupo VI. A) Adenocarcinoma cribriforme com elevada quantidade de estroma, (HE, 100x). B) Tecido conjuntivo em destaque onde se observa uma porção com forte infiltração celular, (TM, 50x). C) Metacromasia de mastócitos mostrando grande presença destas células no tecido conjuntivo, em maior detalhe na imagem de pormenor, (AT, 50x e AT, 400x). D) Neoplasia da glândula mamária, do grupo VIb, em fase de remissão composta quase exclusivamente por tecido conjuntivo e algumas células epiteliais, que na imagem de pormenor, têm uma morfologia bem diferenciada com pigmentação intracelular dourada, (HE, 50x e HE, 400x). E) Coloração por tricrómico de Masson, confirmando a natureza conjuntiva do estroma fibroso, (TM, 50x e 400x). F) Coloração especial com azul da Prússia evidenciando a natureza férrica da pigmentação dourada intracelular das células epiteliais, (AP, 50x e 400x). 153

Figura 71 – Caracterização imunohistoquímica do grupo VI. A) Imunomarcação para o receptor de estrogénio onde se observam uma baixa percentagem de células positivas, detalhe ampliado com algumas células positivas (x100 e x400). B) Células em proliferação marcadas pelo anticorpo anti-Ki67 com distribuição principalmente no estroma tumoral (100x). C) Células em apoptose marcadas pelo anticorpo anti-caspase 3 do sub-grupo VIa (x400) e D) sub-grupo VIb onde se observa um pormenor ampliado com imunomarcação de intensidade 2, (100x e 400x). E) Linfócitos T positivos por imunomarcação pelo anticorpo anti-CD3 do sub-grupo VIa com localização maioritariamente no estroma tumoral, pormenor ampliado com clara visibilidade dessa distribuição, (50x e 200x). F) Linfócitos T positivos para imunohistoquímica anti-CD3 do sub-grupo VIb, (400x) G) e H) estroma tumoral com marcação pelo anticorpo anti-osteopontina de nível I no sub-grupo VIa e nível 3 no sub-grupo b, respectivamente, (100x e 200x).

..... 156

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Factores de risco de neoplasias de mama em humanos. Adaptado de Schwartz, 2009. [26].	5
Tabela 2 – Síntese das células que constituem o microambiente tumoral e a dualidade das suas acções pró-oncogénicas e anti-oncogénicas. Adaptado de Hanahan, 2012; Fukuda, 2012; Grivennikov, 2010; Sansone, 2011; Castaño, 2012 [125, 128, 131, 133-135].	36
Tabela 3 – Factores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos. Adaptado de Harrington, 2011 [44].	43
Tabela 4 – Principais químicos carcinogénicos. Adaptado de Stricker, 2013 [47].	46
Tabela 5 – A glândula mamária em mamíferos de interesse veterinário e de interesse experimental numa perspectiva comparativa com a espécie humana. A anatomia e os tumores espontâneos. Adaptado de Rowson, 2012, Veltmaat, 2013, Proper, 2013, Baba, 2007 e Sorenmo, 2011 [5, 29, 36, 173-177].	47
Tabela 6 – Classificação histopatológica do cancro de mama pela Organização Mundial de Saúde. Adaptado de Tos, 2013 [171].	53
Tabela 7 – Classificação histopatológica dos tumores de mama de cão, gato e rato/murganho. Adaptado de Misdorp, 1999, Costa, 2002, Rudman, 2012, Baba, 2007, Man, 1996 [1, 29, 209-211].	54
Tabela 8 – Classificação molecular dos tumores de mama em humanos. Adaptado de Santagata, 2014, Tos, 2013 e Goldhirsch, 2011 [55, 171, 216].	55
Tabela 9 – Resumo das funcionalidades e dos efeitos celulares decorrentes da síntese das proteínas de choque térmico. Adaptado de Khalil, 2011 [271].	69
Tabela 10 – As aplicações da termoterapia em oncologia. Adaptado de Chichel, 2007 [245].	71
Tabela 11 – Características farmacocinéticas da vitamina D e dos seus principais metabolitos. Adaptado de Vieth, 2011 [322].	79
Tabela 12 – Sumário dos mediadores da mineralização óssea e a sua associação com tumores de mama. Adaptado de Cox, 2013 e Donnelly, 2011 [336, 342].	87
Tabela 13 – Efeitos fisiopatológicos desencadeados pela osteopontina (OPN). Adaptado de Mazzali, 2002 [344].	88
Tabela 14 – Comparação da oncogénese entre o murganho, o rato e o Homem. Adaptado de Medina, 2000 [366].	90
Tabela 15 – Parâmetros de clínica laboratorial ao hemograma e bioquímica sérica avaliados nos grupos I, III, IV e VI. Indicação dos valores de referência considerados normais em ratos fêmeas com 17 ou mais de semanas de idade, conforme [395].	102
Tabela 16 – Resumo dos grupos e das respectivas manipulações a que foram submetidos os animais incluídos neste estudo. N – dimensão da amostra; IND – indução da neoplasia; PTF – protocolo da termoterapia focal; TC – terapia complementar.	104
Tabela 17 – Anticorpos primários utilizados neste estudo.	112
Tabela 18 – Resumo da avaliação por imunohistoquímica aos grupos que compõem este estudo e respectivo número de preparações submetidas a avaliação.	112
Tabela 19 – Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo I.	117
Tabela 20 – Caracterização imunohistoquímica da glândula mamária inguinal direita de seis ratos fêmea virgem da estirpe Sprague Dawley com 34 semanas de idade.	120
Tabela 21 - Tabela de frequência percentual da semiquantificação das características tumorais relevantes para a caracterização tumoral, em função do grau tumoral obtido pelo método NGS em microscopia de luz. Os 148 tumores colhidos e analisados constituem a totalidade (100%).	128
Tabela 22 – Autovalores e evolução da recuperação de dados relativos ao número de componentes principais para o conjunto original de dados, composto por 148 neoplasias da glândula mamária.	129
Tabela 23 – Contribuição dos parâmetros histológicos para as duas primeiras componentes principais (CP ₁ e CP ₂). As contribuições mais relevantes estão destacadas a azul.	129
Tabela 24 – Parâmetros responsáveis pela discriminação de tumores com o mesmo grau e com grau diferente	130
Tabela 25 – Caracterização imunohistoquímica de 14 neoplasias da glândula mamária de rato fêmea virgem da estirpe Sprague Dawley com 34 semanas de idade, induzidas por DMBA aos 50 dias de idade, sendo 6 neoplasias de grau I, 5 neoplasias de grau II e três neoplasias de grau III.	132
Tabela 26 - Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo III.	136
Tabela 27 – Caracterização imunohistoquímica de 2 glândulas mamárias inoculadas com cimento durante uma semana.	137
Tabela 28 – Caracterização imunohistoquímica de 6 neoplasias mamárias tratadas por termoterapia focal na 26ª semana do período experimental.	140
Tabela 29 – Caracterização imunohistoquímica de 6 neoplasias mamárias não-tratadas por termoterapia focal que se desenvolveram em animais tratados à 26ª semana do período experimental.	142
Tabela 30 - Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo IV.	145
Tabela 31 – Caracterização imunohistoquímica do grupo IVa.	148

Tabela 32 – Caracterização imunohistoquímica do grupo IVb.	148
Tabela 33 - Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo VI.	151
Tabela 34 – Caracterização imunohistoquímica de 5 neoplasias mamárias do sub-grupo VIa.	154
Tabela 35 – Caracterização imunohistoquímica de 8 neoplasias mamárias do sub-grupo VIb.	154

Lista de Acrónimos

µg	Micrograma	IP	Intraperitoneal
ADH	<i>Atypic ductal hyperplasia</i>	Kg	<i>Kilograma</i>
aFGF	<i>Acid fibroblast growth factor</i>	LB	Linfócitos B
AH	<i>Alveolar hyperplasia</i>	LDH	<i>Lactato desidrogenase</i>
ALDH	Aldeído desidrogenase	lincRNA	<i>Long intergenic non-coding RNA</i>
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>	lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
ALT	Alanina aminotransferase	LT	Linfócitos T
AP	Azul da Prússia	LTc	Linfócitos T citotóxicos
APC	<i>Antigen presenting cell</i>	LTh	Linfócitos T <i>helper</i>
AST	Aspartato aminotransferase	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
AT	Azul de toluidina	MARSS	<i>Membrane-associated, rapid response steroid-binding</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>	MC	<i>Mast cell</i>
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>	MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
BrDU	Bromodeoxiuridina	MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>	mg	<i>Miligrama</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>	MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
CDKs	<i>Cyclin-dependent kinases</i>	MIB	<i>Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase</i>
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média	miRNAs	<i>Micro RNAs</i>
CHK	<i>Checkpoint</i>	ml	Mililitro
CK	Citoqueratina	mm	Milímetro
CO	Oxalato de cálcio	MNU	<i>N-methyl-N-nitrosourea</i>
CSC	<i>Cancer stem cell</i>	MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
CSF-1	<i>Colony stimulating factor 1</i>	NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
CYP1B1	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1</i>	NGS	<i>Nottingham Grading System</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>	NK	<i>Natural Killer</i>
DCIS	<i>Ductal carcinoma in situ</i>	NRG	<i>Neuregulin</i>
dm	Decímetro	OPN	Osteopontina
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno	OSC	Osteocalcina
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	OSN	Osteonectina
DP	Desvio padrão	PAH	<i>Polycyclic Aromatic Hidrocarbons</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	PAI-I	<i>Plasminogen activator inhibitor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	PARP	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase</i>
EM	Energia electromagnética	PARP	<i>Poly(ADP)ribose polymerase</i>
EM43	<i>Equivalente minutes at 43°C</i>	PAS	<i>Periodic acid schiff</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>	PC	<i>Principal component</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>	PCA	<i>Principal components analysis</i>
FGF	<i>Fibroblasts growth factor</i>	PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
fl	Fentolitró	PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
g	Grama	pg	Picograma
HA	Hidroxiapatite	Pi3k	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF</i>	PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
HCM	Hemoglobina corpuscular média	PIK3CA	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
HE	Hematoxilina e eosina	PIKKs	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases</i>
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>	PKC	<i>Protein kinase C</i>
Hh	<i>Hedgehog</i>	PLCγ	<i>Proteína lipase Cγ</i>
HPF	<i>High perfusion field</i>	PPP	<i>Pentose Phosphate Pathway</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	PR	<i>Progesterone receptor</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>	RAR	Receptor retinóide A
IGF1	<i>Insulin growth factor</i>	RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
IHC	Imunohistoquímica	RNAm	RNA mensageiro
IICs	<i>Infiltrating immune cells</i>	RNI	<i>Reactive nitrogen intermediates</i>
IL-2	Interleucina 2	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
IM	Intramuscular		

RT	Radioterapia
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polimerase chain reaction</i>
RXR	Receptor retinóide X
SAR	<i>Specific absorption rate</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SD	<i>Sprague-Dawley</i>
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
Src	<i>Steroid receptor co-activator</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription,</i>
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i>
TC	Terapia complementar
TDLU	<i>Terminal ductal lobular unit</i>
TEB	<i>Terminal end-bud</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TM	Tricrómico de Masson
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPF	Termoterapia focal
UI	Unidade internacional
uPA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
uPAR	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VDRE	<i>Vitamin D receptor response element</i>
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i>
VGM	Volume globular médio
ZN	Ziehl Neelsen

Resumo

Introdução: As neoplasias da mama são muito prevalentes em medicina humana e em medicina veterinária, principalmente no cão e no gato que partilham os mesmos factores de risco ambientais com os humanos, sendo por isso boas sentinelas imunológicas. Em patologia experimental, a indução química com 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) no *Rattus norvegicus*, em especial na estirpe não-isogénica Sprague Dawley, é muito utilizada em investigação oncológica no estudo de modalidades terapêuticas intratumorais e sistémicas. Nos últimos anos tem havido um esforço no sentido de personalizar as modalidades terapêuticas aos doentes de modo a aumentar a eficácia e reduzir os efeitos tóxicos. A hipertermia focal e a indução de diferenciação celular são usadas em sinergia com as terapêuticas convencionais e, apesar de muito promissoras, económicas, não têm grande aceitação clínica devido à variabilidade de resultados publicados em linhas celulares e em escassos estudos *in vivo*.

Objectivos: Neste trabalho pretendeu-se caracterizar em pormenor o modelo experimental e avaliar o efeito da hipertermia focal e da terapia complementar em ratos com neoplasias da glândula mamária.

Materiais e métodos: Os animais foram agrupados em seis grupos. No grupo I não se efectuou qualquer manipulação. O grupo II recebeu indução carcinogénica com 65mg/Kg de DMBA dissolvido em azeite e administrado por gavagem aos 50 dias de idade. O grupo III foi inoculado na sexta glândula mamária direita com nanopartículas ferrimagnéticas (cimento). O grupo IV foi subdividido num sub-grupo que recebeu vitamina D 20µg/Kg e num outro que recebeu vitamina D 20µg/Kg e dexametasona 0,5mg/Kg. O grupo V recebeu indução carcinogénica e inoculação de cimento na maior neoplasia seguida de dois ciclos hipertérmicos de estimulação electromagnética separados por 48h. O grupo VI recebeu indução carcinogénica e foi subdividido num sub-grupo que recebeu vitamina D e num outro que recebeu vitamina D 20µg/Kg e dexametasona 0,5mg/Kg. Os tecidos recolhidos da glândula mamária e dos tumores foram avaliados por histopatologia e por imunohistoquímica para marcação de receptor de estrogénio, Ki67, caspase-3, HSP70 e osteopontina, em função da pertinência destes marcadores nos diversos grupos.

Resultados: Os grupos que receberam indução neoplásica reproduziram as características descritas no grupo II. No grupo V verificou-se que a hipertermia induziu síntese e libertação de HSP70, necrose e apoptose nos tumores tratados e que nos tumores não-tratados há um aumento da apoptose. No grupo VI, em especial no sub-grupo que recebeu vitamina D e dexametasona, verificou-se que a componente parenquimatosa dos tumores diminuiu acentuadamente restando apenas células com características morfológicas e moleculares com grande semelhança com as células glandulares bem diferenciadas e o estroma dos tumores aumentou devido à síntese de colagénio e de osteopontina.

Conclusão: A hipertermia focal causa regressão dos tumores mamários induzidos por DMBA por indução de necrose e apoptose e desencadeia sinalização celular no sentido de induzir apoptose nos tumores não tratados. A terapia complementar de diferenciação celular com vitamina D e dexametasona é eficaz na transformação morfológica e molecular dos tumores.

Palavras chave: Termoterapia focal; Diferenciação celular; Neoplasias da glândula mamária; DMBA

Abstract

Introduction: Mammary gland neoplasia are among of the most prevalent in both human and veterinary medicine, mainly in dogs and cats that share the same environmental risks with humans, making these animals good epidemiological sentinels. In experimental pathology the chemical induction with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in *Rattus norvegicus*, especially in outbred Sprague Dawley rats, is very used in oncology investigation to study the effect of intratumoral and systemic therapeutic modalities. In the last years an effort has been made toward to personalized cancer treatments in order to increase efficacy and minimize toxicity. Focal hyperthermia and the induction of cellular differentiation are employed with conventional therapies and, despite its economy and efficacy, they aren't very well accepted among oncology clinic due to a wide variety of published results in cellular lines and few *in vivo* studies.

Objectives: This investigation was oriented to characterize the experimental model and submit the rats with mammary gland neoplasia to focal hyperthermia and cellular differentiation towards to osteoblastic cell line by using vitamin D and dexamethasone.

Materials and methods: The animals were constituted in six groups. Group I had no manipulation, group II received tumoral induction with DMBA 65mg/Kg in olive oil by gavage at 50 days of age, group III had inoculation of a ferromagnetic nanoparticles (cement) at the sixth right mammary gland, group IV was subdivided into a sub-group that received vitamin D 20µg/Kg and in another that received dexamethasone 0,5mg/Kg, group V received carcinogenic induction and inoculation with cement in the largest tumor and went on two cycles of electromagnetic stimulation separated by 48h. Group VI had carcinogenic induction and was subdivided into a sub-group that received vitamin D 20µg/Kg and in another that received vitamin D 20µg/Kg dexamethasone 0,5mg/Kg. The mammary gland tissues and tumoral tissues were collected and evaluated by histopathology and immunohistochemistry for estrogen receptor, Ki67, caspase-3, HSP70 and osteopontina, according to each group specificities.

Results: The groups with carcinogenic induction reproduced the features of group II. The hyperthermia on group V stimulated the synthesis and release of HSP70, necrosis and apoptosis on the tumors with cement inoculation, in the other tumors there was an increase of apoptosis. On group VI, mainly on sub-group with vitamin D and dexamethasone, there was a decrease parenchymal component of tumors, only lasting a few epithelial cells with morphologic and molecular characteristics with well differentiated mammary gland cells while the tumor stromal component had a remarkable increase with synthesis of collagen and osteopontine.

Conclusion: Focal hyperthermia causes DMBA induced mammary neoplasia regression by necrosis and apoptosis and triggers intercellular signaling for apoptosis induction on non-treated tumors. The complementary therapy for cellular differentiation with vitamin D and dexamethasone is able to change morphology and molecular appearance of these tumors.

Key words: Focal hyperthermia; Cellular differentiation; Mammary gland neoplasia; DMBA

Introdução

Capítulo I

Introdução, 3

Oncobiologia, 8

Carcinogénese – Características

Identitárias, 16

A etiologia da carcinogénese, 45

Diagnóstico histopatológico das neoplasias da mama - Classificação, terapêuticas convencionais e prognóstico, 47

Terapêuticas Emergentes:

Hipertermia, 63

Diferenciação celular, 78

Modelos experimentais em investigação oncológica, 89

Capítulo I

Introdução

Desde os seres vivos mais simples até aos mais complexos, o estudo da patologia comparativa permite reconhecer uma grande conservação no funcionamento celular [1, 2]. Na evolução filogenética verificam-se marcadas semelhanças em muitos genes e proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal como as que controlam a estrutura da cromatina, a extensão do telómero, a transcrição do RNA, a modificação e estabilidade das proteínas, a regulação do citoesqueleto, a mobilidade celular, a angiogénese e até a mais recentemente desenvolvida, epigenética [2].

As neoplasias da glândula mamária surgem em todos os grupos taxonómicos de mamíferos com semelhanças etiológicas e morfofuncionais de interesse médico e médico-veterinário [2-4]. Os modelos de investigação oncológica em animais como roedores, roedores atímicos transplantados com linhas celulares, animais geneticamente modificados ou animais com tumores induzidos por químicos são um ponto de partida para a exploração da oncologia humana e veterinária [3]. Não obstante estes modelos experimentais, é consensual que os tumores espontâneos em animais, em especial no cão e no gato, são mais semelhantes aos humanos em todo o seu desenvolvimento etiopatofisiológico [3-8]. Disso mesmo são exemplo as diferenças de prevalência entre carnívoros e herbívoros, e entre animais em cativeiro e em estado selvagem, merecendo atenção quanto à possível influência da dieta, história reprodutiva e contraceção hormonal no desencadeamento das neoplasias mamárias. Cães e gatos domésticos têm a maior prevalência destes tumores, sendo os do gato maioritariamente agressivos [4]. À semelhança dos tumores de mama da mulher, também a expressão dos receptores de estrogénio e de progesterona variam nos animais, bem como a proliferação e a sobrevivência [4]. A oncologia experimental, a medicina humana e a medicina veterinária, entendidas na perspectiva de “uma medicina”, podem adicionar grande valor ao conhecimento da carcinogénese mamária com claros benefícios para a prática clínica [2-4].

A história da oncologia humana e a história da oncologia veterinária são muito semelhantes [9]. Achados paleontológicos confirmam a antiguidade das neoplasias mamárias, ainda que os primeiros registos sejam egípcios e datem de 3000 a.C., por Edwin Smith Papyrus, e de 1600 a.C., por Ebers Papyrus, relatando casos de tumores em mama [9, 10]. O tratamento preconizado por esta civilização incluía a cauterização, a excisão cirúrgica e a aplicação de sais e pastas de arsénico [9, 10]. Na Grécia, Hipócrates (460-375 a.C.) sistematizou o conhecimento e comparou o cancro a um “Karkinos” – caranguejo – para descrever a emissão de prolongamentos a partir de um corpo central [10, 11]. O médico romano Celsus (25 a.C.- 50 d.C.), que fez do latim a língua base da medicina, traduziu do grego *karkinos* para *cancer*, a fim de ser aplicado aos tumores malignos [9, 10]. O grego Galen (129–210 d.C.), médico do imperador romano Marcus Aurelius, usou a palavra grega para tumefacção – *onkos* – para descrever os tumores em geral [9]. Aetius (527-565), médico em Constantinopla, introduziu a mastectomia e tratava de outros tumores não-ulcerados por cauterização [10]. No

século XVI, Paracelsus (1493-1541), médico suíço, sistematizou a utilização de químicos no tratamento oncológico como o chumbo, enxofre, ferro, zinco, cobre, arsénico, iodo e potássio [12]. Ambroise Paré (1510-1590), médico francês, introduziu a cirurgia de remoção tumoral com grande margem de segurança [12]. Jean Fernel (1497-1558), médico francês, é reconhecido pela introdução dos termos fisiologia e patologia no seu livro *Morbis Universalibus* onde uma secção é dedicada à oncologia [12]. O italiano Marco Aurelio Severino (1580-1656) sistematizou a comparação entre os achados cirúrgicos e os achados patológicos; no seu livro, *De Recondita*, descreve tumores malignos e benignos em diferentes órgãos, tendo sido um grande avanço para o estudo da oncologia [12]. O cirurgião alemão, Johannes Scultetus (1595-1645) no seu *Armamentarium Chirurgicum*, 1655, descreve a mastectomia seguida de cauterização. Em 1740 abriu em França o primeiro hospital para doentes oncológicos [12] e em 1846, William Halsted introduziu a mastectomia radical supondo que se espalhava de modo centrífugo [11, 13]. Rudolf Virchow, em 1863, com a microscopia de luz, deduziu que a origem dos tumores está nas células, e em 1889 Stephen Paget teorizou que as metástases se formam segundo o modelo da “semente no solo”, sendo esta hipótese, hoje, totalmente validada [11, 13]. Peyton Rous, em 1913, deu um avanço na etiologia ao descobrir que o cancro aviário tem uma causa vírica e Theodor Boveri, em 1914, que se deve a mutações nos cromossomas [13]. Em 1944, Oswald Avery descobriu que a informação se transmite entre as células através de DNA, o que levou à descoberta da ácido nucleico por Watson e Crick em 1953 [13]. Em 1959 o código genético estava descoberto, por Nirenberg e colaboradores, que estabeleceram a transmissão da informação do DNA para RNA, tendo-lhe chamado transcrição, e deste para proteínas, sendo este processo a tradução [13]. Em 1970 Smith e Wilcox identificaram, em bactérias, a transcriptase reversa como sendo uma enzima de restrição que permite a quebra de regiões específicas de DNA, dando origem a uma revolução molecular e biotecnológica na sequenciação do genoma [13]. A era da radioterapia começou em 1895 com a descoberta dos raios X por Röntgen, e em 1898 por Pierre e Marie Curie, com aceleração dos raios-x pelo *radium*. Desde 1950, a radioterapia desenvolveu-se devido à introdução da teleterapia pelo cobalto associada aos avanços computacionais. Actualmente os radiologistas determinam a dose exacta depositada no volume espacial de interesse com poupança dos tecidos normais envolventes [11, 13]. Também a quimioterapia dita simples, combinada e adjuvante teve uma evolução crescente desde a passagem para o século XX, mas o grande avanço foi a terapia personalizada com o desenvolvimento de fármacos e anticorpos específicos para alvos moleculares das diferentes neoplasias da mama [13].

As doenças oncológicas são mais comuns na actualidade do que na antiguidade [14, 15]. O aumento da população mundial e da longevidade são alguns dos factores que explicam a prevalência crescente, com tendência a aumentar ainda mais durante as próximas décadas [14, 15]. Os avanços no diagnóstico precoce e no tratamento, por exemplo, das neoplasias malignas de mama permitiram que a taxa de sobrevivência a 5 anos tenha subido de 50% na década de 70 para os actuais 80% [16]. Este desenvolvimento reflecte o trabalho criterioso da investigação translacional multidisciplinar na pesquisa de tratamentos individualizados mais eficazes [16-18].

O cancro de mama é o mais comum no mundo e o mais letal em mulheres [14-16, 19, 20], e a sua incidência varia com a raça/etnicidade [15] e com a geografia mundial, sendo 2,5 vezes maior em países desenvolvidos do que em países menos desenvolvidos [19-21], em especial nos que se localizam em maiores latitudes, ou seja os que recebem menos quantidade de radiação ultravioleta B (UVB) [22].

Nas últimas cinco décadas, países como a China, Índia e outros países asiáticos, tiveram notáveis melhorias nos cuidados de saúde e quase duplicaram a esperança de vida ao nascimento, ao mesmo tempo que a taxa de natalidade foi dramaticamente reduzida e o estilo de vida foi “ocidentalizado” [14, 20]. Estima-se, por isso, que estes países venham a ter o maior aumento mundial de população idosa e de doentes oncológicos [20], já que as alterações epigenéticas dependentes da idade potenciam a carcinogénese [23, 24]. No entanto, as neoplasias de doentes idosos são menos agressivas do que em pessoas mais jovens [20, 23, 24]. Perante esta perspectiva é necessário investir na promoção da saúde, na investigação oncológica em busca de meios de prevenção, de diagnóstico precoce e terapêuticas de baixo custo [14, 19, 20]. Em 2012, as doenças oncológicas da mama foram as mais frequentes em todos os países da Europa, com maior incidência e mortalidade nos países da Europa Ocidental e do Norte (Bélgica, França, Holanda, Reino Unido, Dinamarca, Islândia e Finlândia) e menor incidência nos países de Leste. [14, 25]. Nos países europeus do sul, a mortalidade é elevada relativamente à baixa incidência [25]. A zona EURO tem uma população envelhecida, sistemas de saúde com boas práticas de registo, grande investimento em diagnóstico precoce e tratamentos avançados disponibilizados à maioria da população [14, 25]. Estes factores explicam parcialmente a relação aumentada entre a população existente e a incidência destas neoplasias comparativamente com o resto do mundo [14, 25]. Os estudos epidemiológicos tendem a estabelecer correlações entre factores ditos, de risco, e doenças oncológicas, que permitem estabelecer linhas de orientações pertinentes em investigação. Os factores de risco mais significativos com associação às neoplasias da mama em mulheres são mutações, nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, *PTEN* ou *TP53*, o desenvolvimento de carcinoma lobular *in situ*, hiperplasia ductal atípica ou hiperplasia lobular atípica, e mulheres com familiares de primeiro grau com cancro de mama sem mutação génica, (Tabela 1).

Tabela 1 – Factores de risco de neoplasias de mama em humanos. Adaptado de Schwartz, 2009. [26].

Factores de risco mais significativos	Factores de risco menos significativos
Mutações associadas a cancro hereditário	Maternidade ausente ou tardia
História familiar de primeiro grau <60 anos	Menarca precoce
Radiação torácica <30 anos	Menopausa tardia
DCIS, LCIS, ADH, ALH	Terapia hormonal de substituição
Antecedentes de cancro de mama ou de ovário	Lactação inexistente
Idade	Sedentarismo Familiares até ao segundo e terceiro grau Alcoolismo ou tabagismo Classe socio-económica elevada Deficiência em vitamina D
ADH, <i>atypical ductal hyperplasia</i> ; ALH, <i>atypical lobular hyperplasia</i> ; DCIS, <i>ductal carcinoma in situ</i> ; LCIS, <i>lobular carcinoma in situ</i>	

Apesar da elevada penetrância de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, os tumores de mama hereditários não correspondem a mais do que 5% a 10%. A modulação matemática sugere que, para o restante risco, há uma interação, ainda mal entendida, entre o ambiente e genes complexos ou múltiplos genes de baixa penetrância [27]. Destes factores de risco citam-se por exemplo, a ausência de maternidade ou maternidade tardia, menarca precoce, menopausa tardia, reduzida actividade física, obesidade, deficiência em vitamina D, consumo de tabaco ou álcool, uso de contraceptivos orais e terapia hormonal de substituição. Já a amamentação está relacionada com uma redução de risco desta doença [14, 19-21, 26-28].

A epidemiologia veterinária e a oncologia comparada ajudam a explorar e a identificar interacções entre o ambiente e os animais que podem ser úteis em oncologia humana [4, 29]. A oncologia comparada é uma área de estudo que tem avançado muito nos últimos anos [8], em especial após a sequenciação do genoma do cão e a descoberta das muitas semelhanças com os grupos de genes associados a neoplasias em humanos e murganhos como o *ERBB3*, *TP53* e *Bcl-2* [30, 31]. As semelhanças relativas à etiologia, constituição, distribuição, diagnóstico, resposta terapêutica e evolução clínica de algumas neoplasias, reconhecidamente comparáveis às humanas, como tumores de mama, linfoma, melanoma, osteossarcoma, carcinoma prostático e sarcoma justificam este interesse crescente [5, 7, 8, 30, 32-34].

Em todo o mundo, e ao contrário dos registos médicos, a informação epidemiológica relativamente à incidência de neoplasias em animais de companhia é escassa e baseia-se em registos esporádicos de curta duração [33]. O cão e gato são de grande interesse, uma vez que atingem a longevidade suficiente para o aparecimento de tumores espontâneos e, simultaneamente, partilham com os humanos características biológicas e clínicas, bem como factores de risco genéticos e ambientais [4-6, 8, 32, 33, 35]. Adicionalmente, muitos tipos histopatológicos de tumores de mama estão associados a alterações genéticas semelhantes em cães e humanos [7, 30] como a expressão aumentada de *Bcl-2*, *Bcl-XI*, *HSP70* e *HSP90* e diminuição da expressão dos genes da apoptose, *Bax* e *caspases* [35]. Estes tumores da glândula mamária têm ainda outras analogias: são a neoplasia mais comum em canídeos e humanos, em ambos a incidência aumenta com a idade, [2, 6, 29, 36, 37], e embora seja mais comum nas cadelas do que em mulheres [38], a maioria tem origem epitelial e metastiza para os pulmões [35, 36, 39] além de outras características moleculares, genéticas, biológicas, dietéticas, hormonais e terapêuticas que valorizam o estudo dos tumores de mama espontâneos em animais de estimação [4-6, 29, 36, 37]. Estas semelhanças fazem do cão e do gato sentinelas etiológicas e epidemiológicas da mudança de padrão do desenvolvimento de cancro em humanos úteis, eventualmente úteis para estudos farmacológicos [2, 4-6, 8, 30, 32, 33]. A flutuação de incidência de alguns tumores em animais de companhia precede em dois anos a flutuação dos mesmos em humanos, importando por isso investir em registos oncológicos detalhados, estandardizados e actualizados em medicina veterinária [6, 33].

Sabe-se que os tumores de mama são frequentes em cão e gato e muito esporádicos nas restantes espécies domésticas e selvagens, sugerindo que factores dietéticos, reprodutivos e imunitários têm influência na tumorigénese [4, 29]. Na população hospitalar de cadelas, o risco de contrair uma doença oncológica é estimado em 199/100.000 com variação racial, sendo aproximadamente metade localizados em uma ou várias glândulas mamárias, sobretudo nas posteriores. Na sua maioria são hormonodependentes com comportamento variado, já que cerca de 60-70% são considerados benignos e 30-40% malignos [4, 29]. Em

gatas, o risco de vir a ter uma doença oncológica desce para 25,4/100.000, sendo que os tumores localizados nas glândulas mamárias ocupam o terceiro lugar [4], considerados maioritariamente malignos e menos hormonodependentes do que em cadelas, surgindo igualmente em idades avançadas [29]. Com frequência, em ambas espécies, surgem em mais do que uma glândula mamária com variação histopatológica, o que sugere que para além das causas carcinogénicas externas, são os factores internos, nomeadamente a contextualização das células transformadas, que determinam a evolução e o comportamento das neoplasias [4].

Em animais selvagens os tumores de mama espontâneos surgem em felídeos e canídeos de cativeiro e, muito esporadicamente, em mustelídeos, ursídeos, viverrídeos, marsupiais e cetáceos [4]. Em ungulados domésticos e selvagens os tumores de mama são muito raros, mesmo nas espécies com raças apuradas para o desenvolvimento mamário e de alta produção leiteira, indicando que alguns factores de risco são independentes do estado reprodutivo e genético [2, 4]. Uma excepção interessante a esta aparente baixa prevalência em animais selvagens é a ocorrência de adenocarcinoma mamário em baleias beluga (*Delphinapterus leucas*) no Canadá onde se suspeita que a poluição da água com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos tenha influência na taxa anual de cancro de 163/100,000 indivíduos desta espécie [4, 40].

Oncobiologia

As células com instabilidade genómica, incapazes de formar estruturas funcionais, que se multiplicam de forma anárquica, sem organização, e formam no seu conjunto, um sistema heterogéneo e autónomo são consideradas neoplásicas [27, 41-43]. Os tumores são constituídos por populações celulares neoplásicas, dentre as quais células estaminais e células mesenquimatosas, e por populações não-neoplásicas, como os fibroblastos associados ao cancro (*cancer-associated fibroblasts*, CAF), células estaminais do estroma, células endoteliais, pericitos e células inflamatórias [41]. Potencialmente todas as células podem adquirir autonomia proliferativa, razão pela qual as neoplasias podem afectar qualquer órgão [41]. Não obstante as diferenças específicas de alguns tumores, na sua generalidade todos partilham uma grande variedade de características como a sua origem em células normais, muitas características bioquímicas e biológicas, o descontrolo da proliferação, a perda de diferenciação e a invasão dos tecidos envolventes, o que facilita a metastização ulterior para outros locais do organismo [41, 44].

As causas iniciais de iniciação celular são múltiplas e incluem estimulação hormonal prolongada (e.g. estrogénios em neoplasias da mama, androgénios em neoplasias da próstata), vírus, químicos carcinogénicos, radiação, inflamação, alterações genéticas adquiridas ou hereditárias e aneuploidia [41, 45, 46]. Estas etiologias podem ser determinantes *per se*, podem ser necessárias mas não suficientes ou, simplesmente, aumentarem a probabilidade de desenvolvimento tumoral [41]. O desenvolvimento neoplásico baseia-se na existência de mutações genéticas irreversíveis conducentes à tumorigénese como mutações, recombinações e alteração do cariótipo, translocações cromossómicas equilibradas, deleções, amplificação génica com sobreexpressão proteica ou aneuploidia [41, 44, 45, 47-53]. As alterações genéticas e epigenéticas das células tumorais conferem-lhes vantagens de crescimento e de sobrevivência sobre as células normais [44, 47]. Durante a divisão celular ocorrem erros genéticos espontâneos com uma frequência estimada de 10^{-5} a 10^{-6} nucleótidos por ciclo de divisão celular, o que permite uma variabilidade de fenótipos e de variabilidade individual tão importantes para a selecção positiva de adaptação ao ambiente [45, 49]. A reparação de erros genéticos é fundamental para a homeostasia das células e tecidos, mas se as mutações se derem ao nível de um gene que codifica uma proteína do sistema de reparação, os defeitos genéticos da célula subsistem cumulativamente, para além de que podem ser transmitidos às células descendentes por mitose. O fenótipo que daí resulta poderá revelar-se favorável ao crescimento indiscriminado do tipo neoplásico [45, 49].

As lesões genéticas críticas no desenvolvimento tumoral são irreversíveis e envolvem quatro classes de genes reguladores do crescimento e da diferenciação celular: proto-oncogenes, que promovem o crescimento da célula, genes supressores tumorais, inibidores de crescimento, genes reguladores da morte celular programada ou apoptose, e genes envolvidos na reparação do DNA [44, 47]. Oncogenes são proto-oncogenes mutados ou amplificados que induzem alterações fenotípicas nas células [47, 48]. São considerados dominantes porque a mutação de um único alelo pode levar à transformação celular [44, 47]. A maioria dos oncogenes codifica factores de transcrição, proteínas reguladoras de crescimento ou proteínas envolvidas na sobrevivência e nas interacções célula-célula ou célula-matriz [44, 47]. Os genes supressores tumorais que normalmente controlam a proliferação através da paragem induzida do ciclo celular, quando mutados ou

ausentes, permitem o crescimento de um fenótipo transformado [44, 48]. Em geral, nestes genes ambos os alelos têm de estar mutados para que ocorra a transformação fenotípica [44, 47]. Os genes que regulam a apoptose e a reparação do DNA podem actuar como proto-oncogenes ou como genes supressores tumorais [47].

As alterações epigenéticas, de transcrição ou de pós-transcrição, que resultam da regulação alternativa da maturação do RNA transcrito e da expressão de microRNA's, por exemplo, são reversíveis [41]. Mesmo em tecidos normais as células diferenciadas são susceptíveis de desdiferenciação até ao estado estaminal, até ao nível de transdiferenciação ou de remodelação, como ocorre na mama durante a gestação [41]. O fenótipo final das neoplasias pode resultar de um único evento, de uma sucessão cumulativa de eventos oncogénicos ou de um rearranjo cromossómico catastrófico, dependendo de vários factores como a capacidade de activar ou desactivar vários tipos de mutações, da sua localização na cascata de transdução de sinal e da diferenciação tecidual da célula afectada, ou seja, do seu contexto [41].

A glândula mamária normal é formada por células epiteliais luminais e células basais com diferentes estadios de diferenciação, sugerindo uma hierarquia sequencial que vai desde as células estaminais a células epiteliais e mioepiteliais (Figura 1) [54, 55].

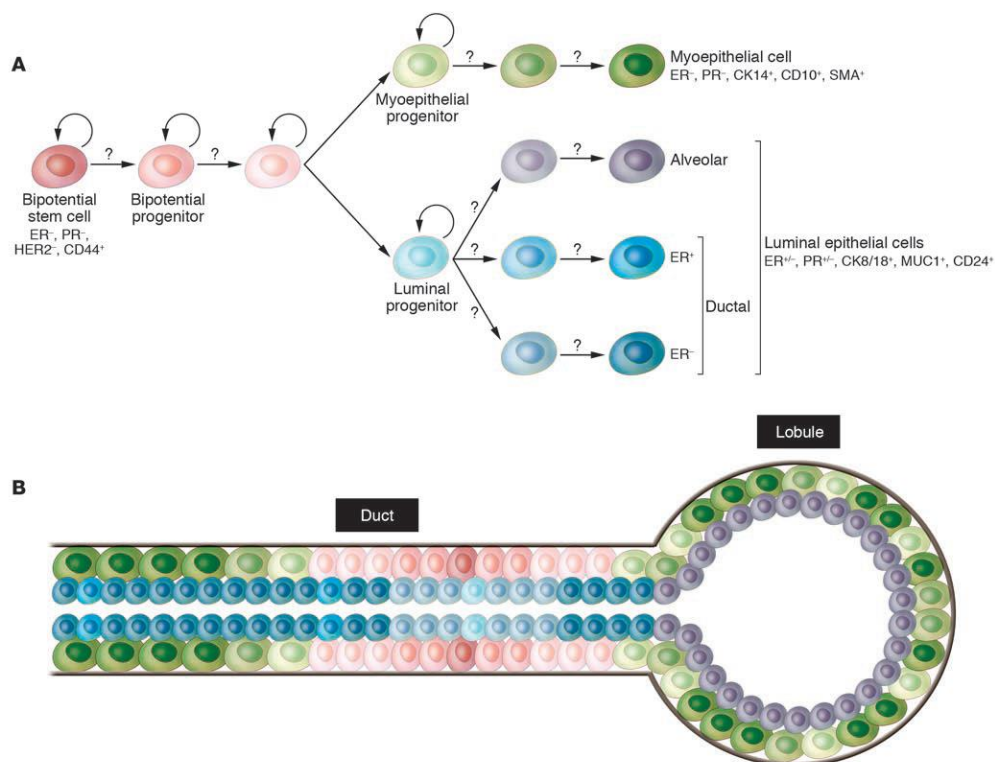


Figura 1 – Modelo simplificado da hierarquia celular e da diferenciação na glândula mamária normal em humanos. (A) Células estaminais dão origem a células luminais e mioepiteliais numa linhagem sequencial de diferenciação ainda mal definida. (B) Representação de uma unidade lobular do ducto terminal com uma distribuição das células estaminais e diferenciadas indicadas em (A). A linha cinzenta representa a membrana basal. CK14, citoqueratina 14; MUC1, mucina 1. Adaptado de Poliak, 2007 [54].

As neoplasias da glândula mamária são formadas por uma população com heterogeneidade morfofuncional no entanto, algumas semelhanças histopatológicas e moleculares permitem o seu agrupamento em vários subtipos tumorais (Figura 2) [56, 57]. Os três principais subtipos tumorais em humanos são os subtipos luminal A e B, o subtipo receptor de factor humano de crescimento epidérmico (*human epidermal growth factor receptor*, HER) e o subtipo basal que está associado a neoplasias mais invasivas e metastásicas [56]. As células basais ou mioepiteliais estão intimamente relacionadas com as células estaminais e com as células progenitoras da glândula mamária, sugerindo que há dois modelos hipotéticos para explicar os distintos subtipos moleculares [56]. Cada subtipo tumoral tem diferenças quanto aos factores de risco, risco de progressão tumoral, órgãos preferenciais de metastatização e resposta ao tratamento [56]. O sub-tipo basal é o mais indiferenciado e, por isso, mais próximo das células estaminais [56].

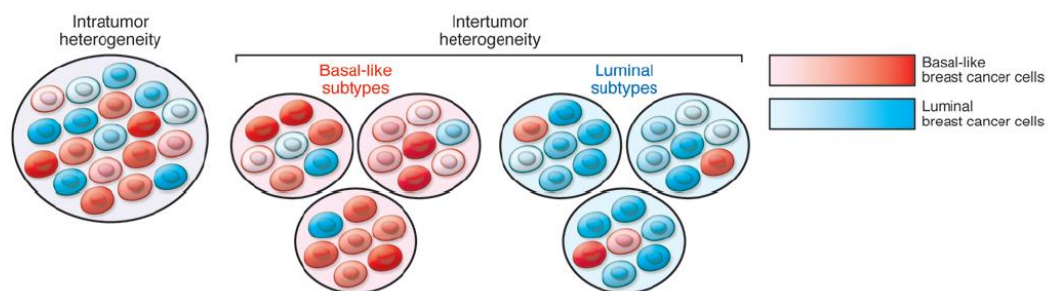


Figura 2 – Representação esquemática da variabilidade celular intra e intertumoral. Semelhanças moleculares permitem o agrupamento dos tumores de mama nos subtipos luminal, onde predominam as células epiteliais mais bem diferenciadas, e no sub-tipo basal, onde predominam as células com menor diferenciação, no entanto, a heterogeneidade celular existe dentro de cada subtipo tumoral. O subtipo HER+ não está representado na figura. Adaptado de Poliak, 2011 [56].

Dois modelos, não necessariamente exclusivos, tentam explicar a origem da(s) célula(s) iniciada(s) que proliferara(m) até à formação de um conjunto celular com heterogeneidade morfofuncional e molecular [57]: o modelo estocástico de evolução clonal, onde se considera que uma célula de origem somática tem potencial de transformação maligna e todas as células tumorais daí resultantes têm as mesmas características comportamentais (Figura 3) [58]; mais recentemente, o modelo das células estaminais no cancro (*cancer stem cell*, CSC) que suporta a ideia de que estas se auto-renovam e multiplicam por mitoses simétricas ou assimétricas dando origem a subpopulações funcionalmente distintas (Figura 3) [58-62]. Estas subpopulações podem ser geneticamente homogéneas com diversidade epigenética e estados variados de diferenciação, o que suporta a heterogeneidade fenotípica, ou geneticamente heterogéneas, uma vez que a instabilidade genética gera mutações ao acaso, incluindo rearranjos cromossómicos, que conferem vantagem selectiva a subclones de células geneticamente diferentes [42, 60, 62, 63]. Em expansões clonais sucessivas há a probabilidade das células adquirirem genótipos mutantes facilitadores de fenótipos de transformação tumoral [60, 62] sujeitos à selecção em função das interacções com o microambiente tumoral [42, 60, 62, 63]. Está reportada a possibilidade de haver cooperação clonal por sinalização parácrina indutora de vias carcinogénicas [64].

As CSCs representam uma dupla ameaça, por um lado são mais resistentes à quimioterapia e radioterapia, por outro preservam a capacidade de regenerar o tumor depois da descontinuação terapêutica [59, 60].

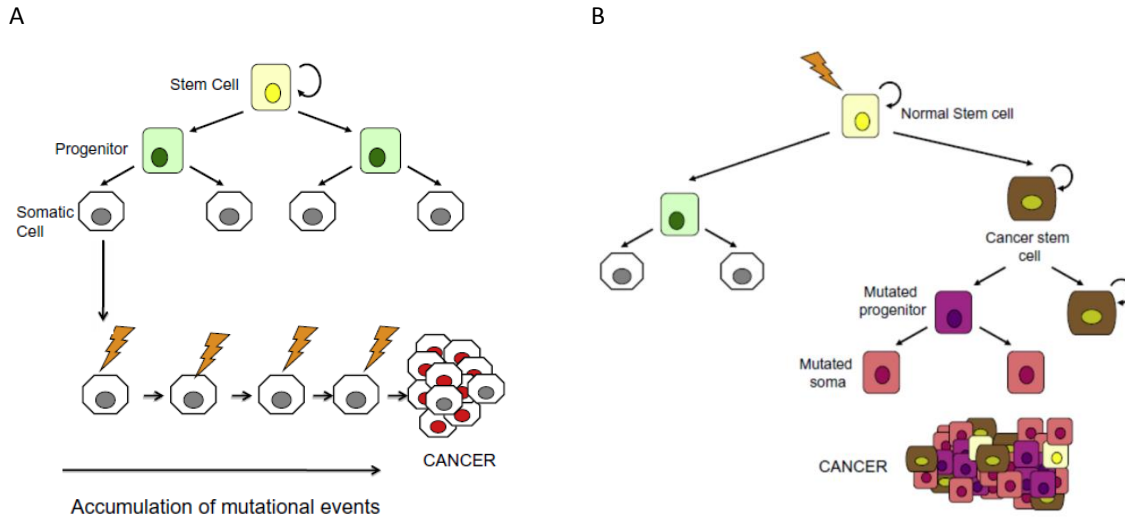


Figura 3 – Modelos de formação tumoral. (A) Modelo estocástico de oncogênese. Células estaminais no topo de uma hierarquia celular normal originam células progenitoras que se multiplicam e diferenciam em células maduras bem diferenciadas. Neste modelo qualquer célula pode acumular mutações genéticas e dar origem à neoplasia, independentemente do seu estado de diferenciação inicial. (B) No modelo das células estaminais do cancro apenas estas podem gerar tumores dada a sua capacidade de auto-renovação e proliferação sustentada. Considera-se ainda que as células estaminais do cancro têm origem em células estaminais normais mutadas que, por multiplicação, dão origem a um conjunto heterogêneo de células progenitoras e células maduras. Adaptado de Pang, 2010 [58].

A aplicação destes modelos às neoplasias mamárias (Figura 4) resulta na possibilidade dos tumores mais bem diferenciados, luminais A e B e HER+, poderem ter origem na transformação de células progenitoras das células luminais, enquanto que no subtipo basal se referenciam as células menos diferenciadas tipo-estaminal. Alternativamente existe ainda a menção de que no modelo das CSCs, todos os tumores possam ter uma possível origem numa célula estaminal com mutações relevantes, no entanto, há evidência de que as células progenitoras luminais evidenciam potencial de originar tumores tipo-basal após terem acumulado mutações genéticas ou epigenéticas favorecedores da mudança de fenótipo [56, 57].

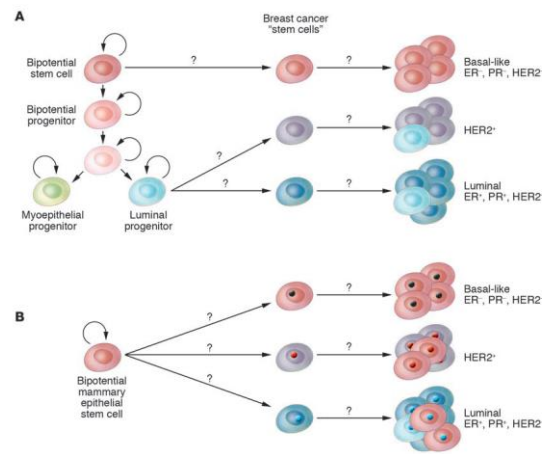


Figura 4 – Modelos hipotéticos que explicam os subtipos tumorais referenciados na glândula mamária em humanos. (A) No modelo de expansão clonal os diversos subtipos tumorais têm origem em diferentes tipos celulares, presumivelmente em células estaminais ou em células progenitoras. (B) No modelo das células estaminais do cancro, a célula de origem pode ser a mesma para diferentes subtipos tumorais e o fenótipo é determinado pelos acontecimentos genéticos e epigenéticos. Adaptado de [54].

Os dois modelos apresentados não são necessariamente oponentes. Há evidência de que os tumores são hierarquicamente organizados, sendo que o reportório heterogêneo das células tumorais (neoplásicas e não-neoplásicas) é mantido por uma subpopulação com capacidade de reproduzir integralmente no qual as CSCs são as principais implicadas no crescimento sustentado do tumor maligno [57]. No entanto, a célula que está na origem da oncogénese, ou seja, a célula normal que adquiriu a primeira mutação conducente ao crescimento autónomo, pode ser substancialmente diferente das CSCs e não tem de ser uma célula estaminal normal. No caso da iniciação tumoral ocorrer numa célula progenitora com mutações epigenéticas, a sua expansão clonal pode resultar na emergência de uma CSC. Não obstante a esta evolução, a célula progenitora mutada pode, por multiplicação e diferenciação, dar origem a células maduras ou a células estaminais não oncogénicas (Figura 5) [57].

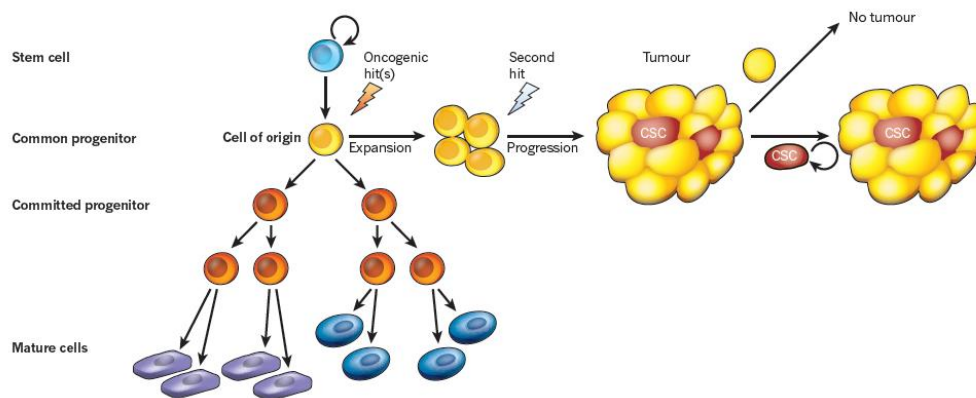


Figura 5 – A célula de origem de uma célula estaminal do cancro e a sua evolução. A célula de origem do tumor, aquela que é iniciada, pode ser distinta da CSC, que propaga o tumor. Neste modelo, apenas as CSC detêm a capacidade de tumorigénese sustentada. A hierarquia celular normal compreende células estaminais que progressivamente geram células progenitoras/percursos de todos os tipos celulares constituintes de um tecido. A expansão de uma célula progenitora iniciada pode originar CSCs e diversas células maduras bem diferenciadas. Adaptado de Visvader, 2011 [57].

As CSCs representam uma pequena população de células num tumor. Expressam marcadores como o CD44, CD24 e enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) estando, contudo, em vários graus de diferenciação [65-67]. Estas células podem originar todo o repertório hierárquico dos tumores, são resistentes à quimioterapia e à radioterapia e têm um papel fundamental na metastização e no reaparecimento de focos metastáticos [65, 67, 68]. As células neoplásicas têm instabilidade genómica que se reflecte na variabilidade fenotípica dos marcadores [68]. Consequentemente alguns autores advogam que as células tumorais não estaminais podem, também elas, dar origem a CSCs [68]. Esta ideia de mudança fenotípica pode ser o ponto de encontro entre o modelo estocástico e o modelo das CSCs para explicar as inconsistências encontradas entre estudos quanto à expressão dos marcadores das CSCs e ao comportamento tumoral [67-69]. Classicamente, o comportamento morfofuncional das neoplasias é classificado em benigno ou maligno em função das suas características [49]. As células malignas têm uma considerável variedade de aspectos biológicos, como proliferação autónoma, invasão dos tecidos adjacentes ou metastização para tecidos distantes não relacionados com o local primário (Figura 6) [49], em oposição, as neoplasias benignas crescem mais lentamente com compressão dos tecidos adjacentes [49].

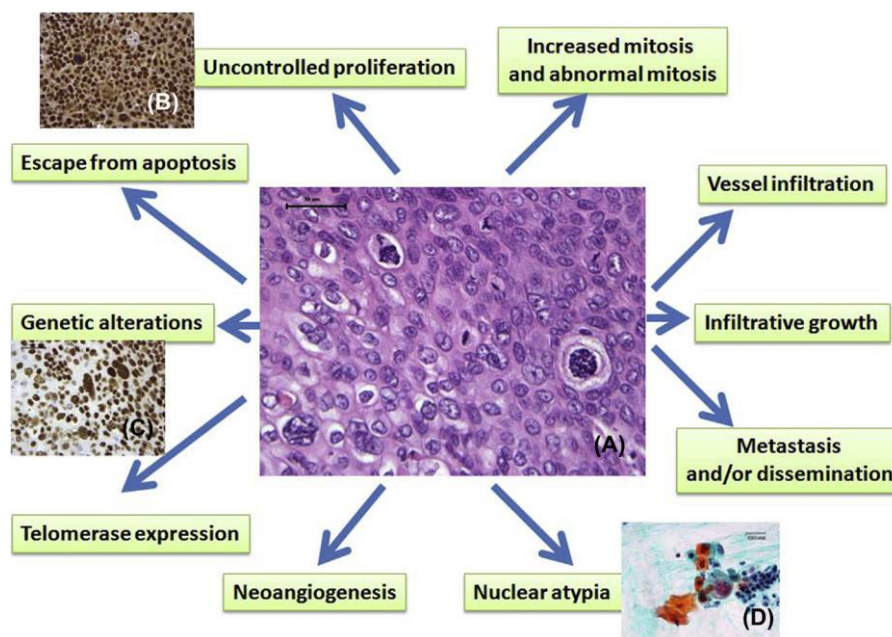


Figura 6 – Características biológicas de células malignas. (A) Histopatologia de um carcinoma espinocelular. HE (B) Imunohistoquímica com anticorpo anti-PCNA. (C) Imunohistoquímica com anticorpo anti-p53. (D) Citologia por raspagem de carcinoma dérmico. Coloração de Papanicolau. Barra de escala de 50 μ m (A e C) e 20 μ m (D). HE, hematoxilina e eosina; PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*. Adaptado de Tanaka, 2013 [49].

Nos tumores ditos malignos, as mudanças histológicas e citológicas reflectem anaplasia ou desdiferenciação, aumento da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular, nuclear e nucleolar, aumento da densidade e da textura da cromatina, perda de organização da arquitectura histológica e invasão do estroma tumoral e dos vasos linfáticos e sanguíneos (Figura 7) [49].

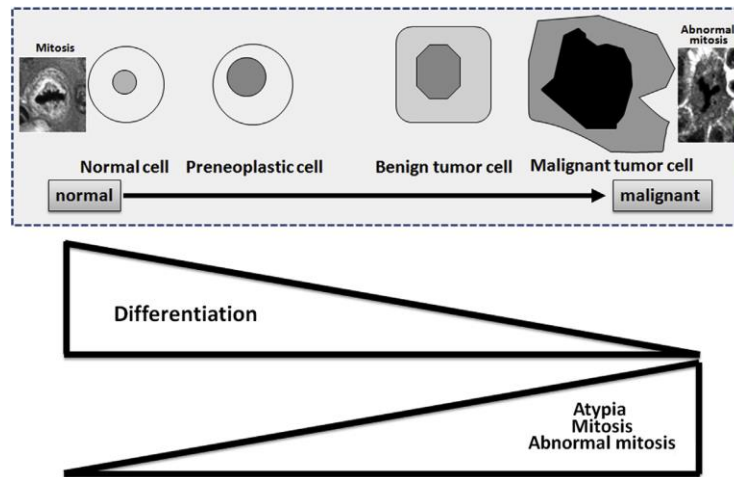


Figura 7 – Desdiferenciação e atipia de células normais, pré-neoplásicas e neoplásicas. A evolução da carcinogénese relaciona-se com a diminuição da diferenciação e com o aumento da atipia nuclear e aumento do número de mitoses, incluindo mitoses anormais. Figuras de mitose simétrica, entendida como normal, assimétrica ou anormal (e.g. assimétrica tripolar). Adaptado de Tanaka, 2013 [49].

O estudo compartimentado da oncogénese, que se verifica na carcinogénese química, identifica três eventos: iniciação, promoção e progressão (Figura 8) [49]. A iniciação é um processo de mutação do DNA numa célula não-neoplásica [49]. A formação de uma célula mutada ou iniciada pode ocorrer por interacção de carcinogénios físicos e químicos com propriedades mutagénicas ou por mutações espontâneas não reparadas pelos mecanismos fisiológicos [49]. A promoção tumoral é um processo de estimulação mitogénica por um agente promotor, químico ou fisiológico endógeno, de acção continuada numa dada concentração que causa o crescimento clonal selectivo da célula alterada [49]. Este processo envolve a modulação da expressão génica com aumento do número de divisões celulares ou a diminuição da apoptose [49, 60, 70]. O aumento da frequência de divisão tumoral aumenta os erros de replicação do DNA e as mutações, mas apenas as células que se evadem à apoptose podem passar à fase seguinte – a progressão [49]. Em histopatologia, a sequência de lesões identificadas entre a iniciação e a promoção designam-se de pré-neoplasias e/ou neoplasias benignas [49]. A sua conversão para lesões malignas envolve alterações genéticas ou epigenéticas adicionais e é irreversível [49]. Nesta fase, a proliferação é independente de estímulos e caracteriza-se por instabilidade genética, produção de factores de crescimento, invasão, metastização e alterações bioquímicas, metabólicas e morfológicas das células afectadas [49]. A neoangiogénese é fundamental para a progressão neoplásica [60, 70].

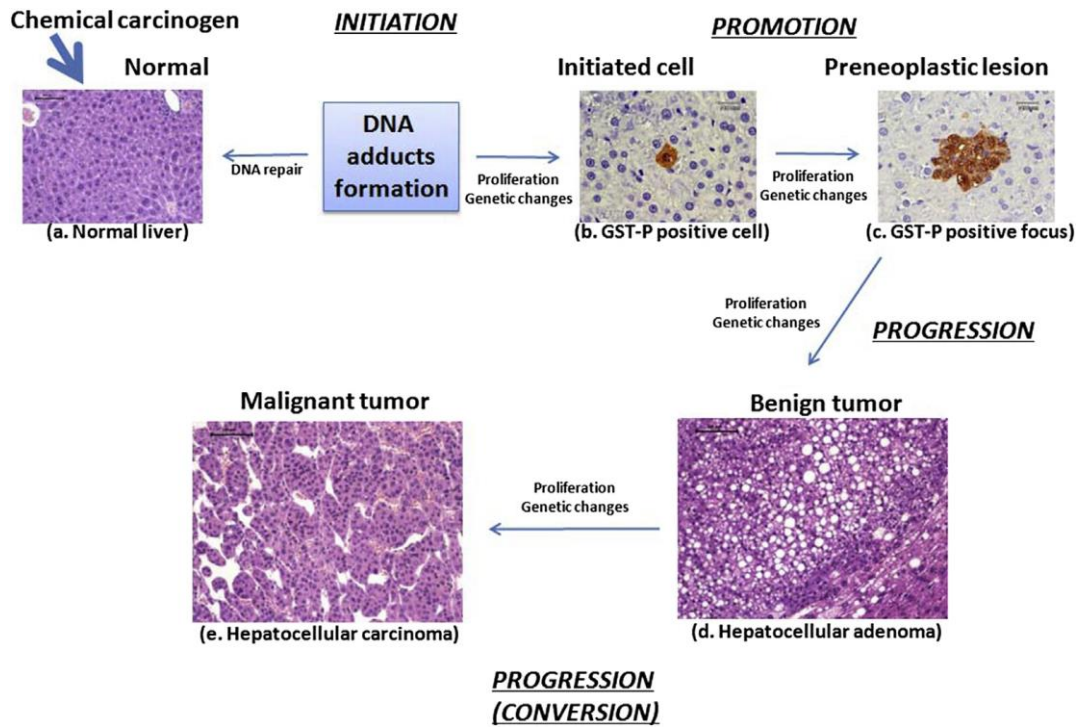


Figura 8 – Carcinogênese química como o paradigma da oncogênese: iniciação, promoção e progressão. Adaptado de Tanaka, 2013 [49].

Carcinogénese – características identitárias

Os tumores são um conjunto de tecidos complexos com tipos celulares múltiplos e distintos que participam entre si em interacções heterotípicas [41, 60]. O estroma associado ao tumor, composto por células não-neoplásicas, tem um contributo importante na tumorigénese, já que é essencial para o desenvolvimento e expressão das capacidades tumorais [41, 60]. Considera-se que a heterogeneidade das células tumorais seja multifactorial, o que não implica que em todas as células alteradas estejam a ocorrer em simultâneo as características identitárias da transformação neoplásica [41]. Múltiplas mutações actuam em sinergia para a selecção de sete características paradigmáticas das neoplasias: (1) perda de diferenciação, (2) auto-suficiência nos sinais de crescimento, (3) insensibilidade aos sinais de anti-crescimento, (4) resistência aos estímulos indutores de apoptose, (5) potencial replicativo ilimitado, (6) angiogénese sustentada e (7) capacidade de invasão e metastização [41, 44, 60]. A expressão destas características é dinâmica e variável no tempo e no espaço [41, 43] e está dependente da selecção natural [60, 70]. Um exemplo paradigmático é a reprogramação metabólica, efeito de *Warburg*, que ocorre em células em anóxia no centro de tumores sólidos, em oposição com as células da periferia, bem oxigenadas, que consomem e oxidam o lactato libertado pelas primeiras [41].

É também na periferia do tumor que ocorre a transformação epitélio-mesenquimatosa (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT), um evento crítico que permite às células transformadas invadir e metastizar [41]. Outro exemplo da não universalidade da expressão destas características aborda a “imortalidade” das células tumorais [41]. Ao longo do tempo, uma parte significativa da população tumoral, heterogénea por natureza, morre ou entra em quiescência ou em senescência, não contribuindo para o crescimento tumoral [41]. Ainda assim, o estudo compartimentado das características oncológicas identitárias, descrito por Hanahan em 2011, é elucidativo do dinamismo e complexidade que envolve a carcinogénese [41, 60, 70], para além de considerar que a selecção de clones progressivamente mais invasivos e pluripotenciais favorece a formação de células estaminais dos tumores (Figura 9) [68].

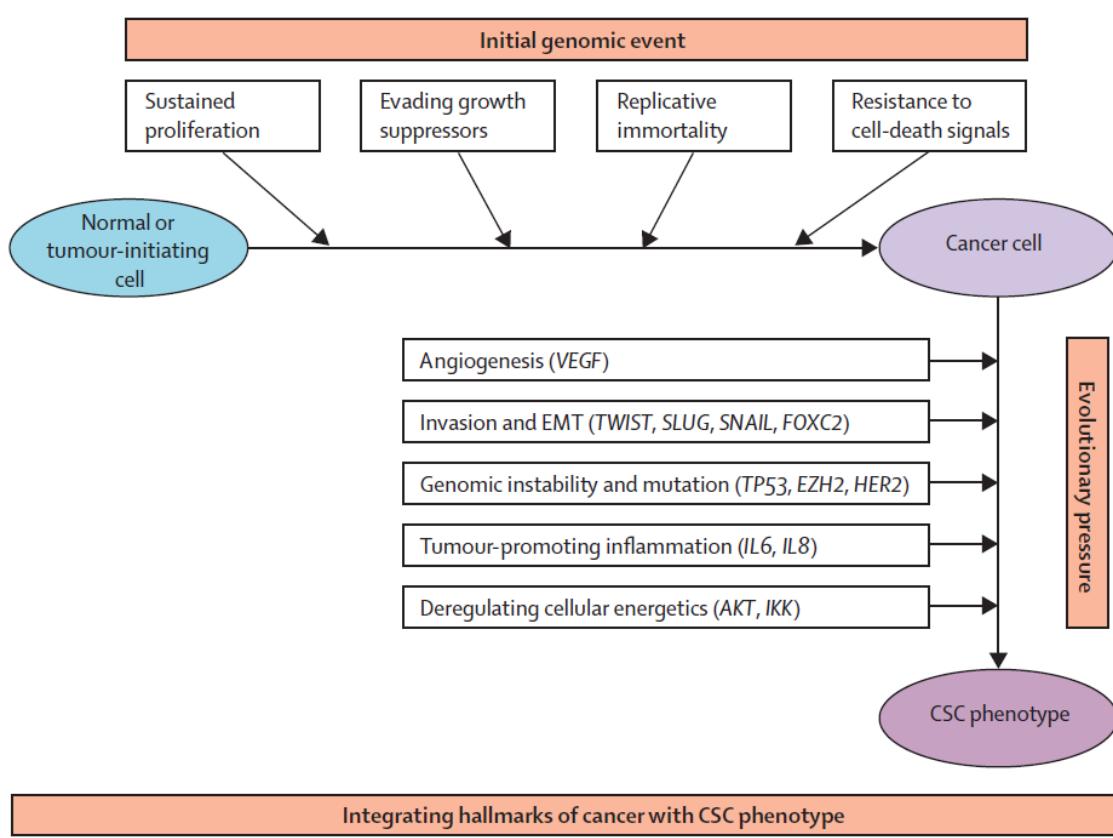


Figura 9 – As características identitárias das neoplasias e a progressão do fenótipo estaminal dos tumores. As mutações em genes críticos na aquisição de fenótipos malignos dão origem a clones com vantagens sucessivas até à selecção de células estaminais dos tumores. Adaptado de Badve, 2012 [68].

As tecnologias de sequenciação caracterizaram o espectro funcional e geográfico das aberrações genómicas e revelou detalhes dos mecanismos de mutação [52]. As variações na sequência de DNA incluem mutações pontuais e aberrações na cópia de DNA, como deleções e adições de porções significativas de genoma, rearranjos genómicos e alterações epigenéticas [45, 51, 52]. Nem todas estas mutações contribuem do mesmo modo para o desencadeamento conducente à formação de neoplasias. Os perfis de expressão génica dos tumores com integração computacional [45, 52] permitem distinguir genes mutados fundamentais para a aquisição de uma característica vantajosa, sendo estas mutações apelidadas de *driver*, de mutações genéticas consideradas neutras para a carcinogénese, denominadas de *passenger* e consideradas como um subproduto da instabilidade genómica [45, 51-53, 71].

As mutações oncogénicas podem ocorrer no sentido de ganho de função das proteínas expressas, como na família tirosina-cinase, ou de diminuição da função, como na p53 [71, 72]. Em geral, envolvem classes de genes das famílias tirosina-cinase, fosfatases, K-RAS, proteinases e caspases [45] e há evidência de que são necessárias cinco a sete mutações *driver*, sendo que a maioria das mutações pontuais são transições de C:G para T:A e transversões de C:G para G:C, em citosinas seguidas de timina sem qualquer explicação actual [45, 71]. As tecnologias genómicas disponíveis para a descoberta de genes cancerígenos são a resequenciação génica, análise de expressão génica, hibridização genómica comparativa, hibridização genómica comparativa baseada em listagem, sequenciação integral do genoma e perfis epigenéticos [72-74].

A organização do DNA em heterocromatina e eucromatina é essencial para a expressão dos genes específicos de determinado tipo celular [75, 76]. A regulação dos genes silenciados e activados depende de mecanismos epigenéticos como metilação do DNA, modificação e remodelação das histonas, RNA não-codificante e remodelação da cromatina (Figura 10) [75-78]. Estes mecanismos estão interrelacionados e precisam de se manter estáveis durante a divisão celular para conservar a identidade genética [76-78]. A exposição ambiental a carcinogénios químicos e físicos, a agentes infecciosos e o estilo de vida podem induzir alterações epigenéticas que levem, durante a mitose, à transformação oncogénica e ao desenvolvimento tumoral [79].

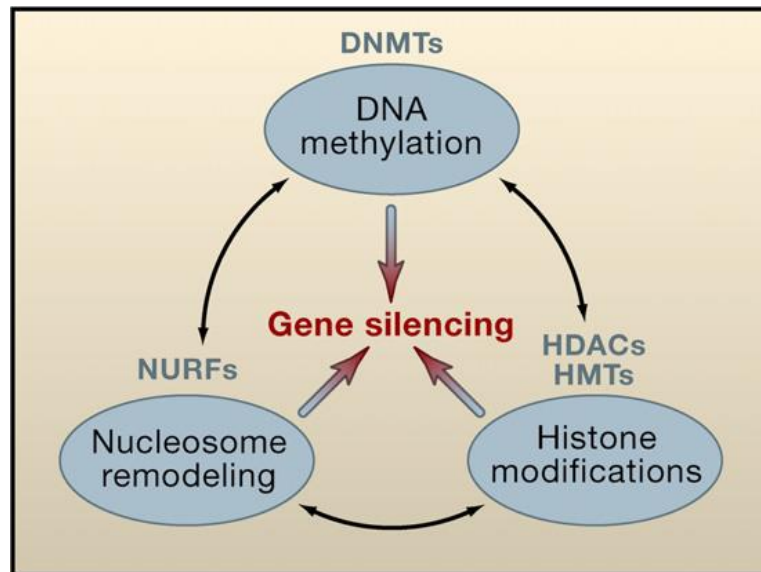


Figura 10 - Silenciamento de genes em células normais. O silenciamento de genes entre divisões celulares inclui, entre outros, a metilação do DNA, as modificações covalentes das histonas e a remodelação dos nucleossomos importantes para o desenvolvimento e diferenciação das células e tecidos. DNMT, *DNA methyltransferase*; HDAC, *histone deacetylase*; HMT, *histone methyltransferase*; NURFs, *nucleosome remodeling factors*. Adaptado de Jones, 2007 [78]

No genoma dos animais vertebrados aproximadamente 70-80% dos dinucleótidos CpG está metilado (-CH₃) no carbono da posição 5 da base de citosina pela acção da enzima DNA metiltransferase, inactivando o gene associado [76, 77, 79, 80]. A globalidade do genoma é pobre em dinucleótidos CpG, embora as ilhas CpG constituam múltiplos focos de DNA não-codificante com uma média de 1000 pares de bases e elevada composição destas bases, frequentemente sem metilação associada [80]. Maioritariamente são locais de início de transcrição e participam na destabilização dos nucleossomos com atracção de proteínas que geram um estado de cromatina transcripcional permissivo [80].

Aproximadamente 70% dos promotores de genes estão associados a estas ilhas, que têm uma função reguladora sobre a transcrição do gene relacionado [80]. O silenciamento destes promotores é alcançado por acentuada metilação CpG ou por recrutamento do complexo enzimático *polycomb* [78, 80], que actua na repressão de áreas selectivas do genoma, na fisiologia das células estaminais e no cancro [76, 80-82]. Já o complexo enzimático *trithorax* está envolvido com a manutenção da expressão génica no estado activo [75, 76]. Uma panóplia de modificações pós-translacionais nas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) permite a demarcação

de estados e regiões específicas de cromatina, em geral por metilação e desmetilação da lisina ou pela acetilação e desacetilação da extremidade N-terminal protuberante do nucleossoma [75, 77]. Em geral, as marcas activas são a acetilação das histonas e a tripla metilação da lisina (K), H3K4, e os marcos inactivos são a metilação do DNA e a tripla metilação da H3K9 e da H3K27 [75-77].

Em células normais as regiões de cromatina inactiva, heterocromatina, tendem a estar associadas à lâmina nuclear enquanto a cromatina activa, eucromatina, está afastada dessa lâmina [77]. A heterocromatina contém regiões hipermetiladas inactivas, densamente organizadas em nucleossomas com marcas repressivas nas histonas (Figura 11) [77]. As regiões activas com eucromatina, ou seja, no estado não metilado com histonas marcadas positivamente, estão no centro no núcleo e contém factores de transcrição como a RNA polimerase II e remodeladores da cromatina, que permitem a transcrição dos genes para mRNA [75, 77].

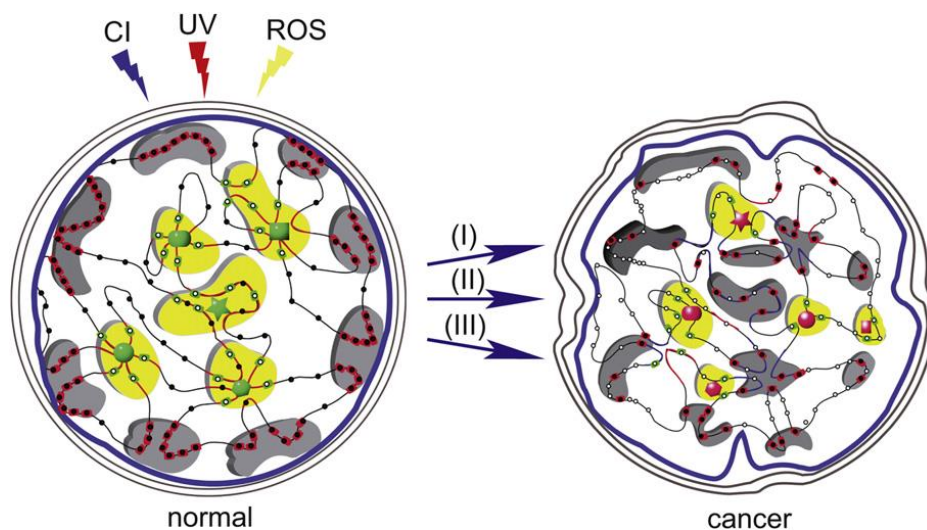


Figura 11 – Estrutura alterada do núcleo e da epigenómica das células neoplásicas. Núcleo normal: zonas activas (amarelo) e inativas (cinza), lâmina nuclear (círculo azul), regiões hipermetiladas inativas (círculos pretos), nucleossomas com marcas repressivas nas histonas (cilindros vermelhos), factores de transcrição (formas verdes), genes activos (linhas vermelhas), genes não metilados (círculos brancos), histonas com marcos positivos (cilindros verdes). Núcleo neoplásico: desmetilação global do DNA (círculos brancos), gene silenciado por metilação do promotor CpG (linhas azuis com círculos pretos), factores de transcrição específicos (formas vermelhas). Adaptado de Hassler, 2012 [77].

A estrutura nuclear das células tumorais, incluindo a textura da cromatina, está alterada e é usada pelos patologistas para o diagnóstico de malignidade, o que está de acordo com as alterações moleculares da epigenética aberrante dos tumores [77]. As epimutações nessas células são reversíveis e mais frequentes do que as mutações génicas, ocorrendo uma reprogramação da epigenética da célula transformada desde as fases mais precoces (Figura 11) [75-78, 83]. O *stress* celular permanente como a inflamação crónica, exposição ultravioleta e espécies reactivas de oxigénio pode induzir uma mudança na estabilidade da epigenética [77]. Na presença de espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*, ROS), a DNA metiltransferase e a histona desacetilase deslocam-se aos locais de DNA danificado mobilizando os grupos metilo de áreas não ricas em GC para áreas ricas em GC, como as ilhas CpG, ficando a globalidade do DNA hipometilado e as ilhas CpG hipermetiladas [82, 83]. A hipometilação global aumenta a homologia da cromatina favorecendo o fenómeno de recombinação, com resultante instabilidade genómica e potencial activação de oncogenes [79]. A hipermetilação das ilhas CpG causa o silenciamento de genes de supressão tumoral e de vias de sinalização envolvidas no controlo do ciclo celular, apoptose e reparação do DNA como o P53, *P21*, *RB*, *MLH1*, *BRCA1* e *MGMT* [75, 77-79, 82]. O fenótipo tumoral com ilhas CpG metiladas opõem-se ao fenótipo não-metilado, sub-agrupando diversos tipos de tumores [77, 84]. As modificações pós-translacionais das histonas pautam-se sobretudo pela perda de heterocromatina repressiva ou silenciamento de genes através da trimetilação H3K27, semelhante às células estaminais embrionárias [75, 77] e também por mutação do PpG, podendo resultar em reparação aberrante do DNA, que afecta a transcrição génica, a replicação do DNA e os pontos de controlo do ciclo celular (Figura 11) [79]. Factores de transcrição específicos das células tumorais mantêm o perfil de expressão génica característico [77]. No caso da glândula mamária, os factores de transcrição Sox2, *c-Myc*, KLF4 são importantes, respectivamente, na pluripotencialidade da célula, na amplificação do mRNA de um oncogene e na estimulação do *c-Myc* e inibição da p53 [75, 76, 78].

Os remodeladores da cromatina são complexos de proteínas dependentes de ATP que catalisam a inserção do nucleossoma, a sua deslocação e remoção e também a substituição das histonas, promovendo a descondensação da cromatina semelhante ao estado pluripotencial das CSCs com favorecimento da proliferação descontrolada [76]. Assim, estes remodeladores são agentes activos da reprogramação celular e oncogénese por inibição de genes supressores tumorais e activação de oncogenes, com ganho ou perda de função, devido a mutações genéticas e translocações e/ou modulação da expressão génica, e regulam os processos de EMT, senescência, instabilidade genómica e metastização [75]. No carcinoma da mama têm relevância os reguladores de cromatina: G9a, Arid1A, MLL3, LSD1 e DNMT3A/B [75].

Os *micro RNAs* (miRNAs) são genes reguladores, pelo que não codificam proteínas, e o seu produto final são pequenas moléculas de RNA compostas por 20-23 nucleótidos [85] que actuam ao nível pós-translacional silenciando a expressão dos genes [77, 85-87]. Estas moléculas tipicamente reduzem a translação e a estabilidade dos mRNA, incluindo oncogenes e genes supressores tumorais que medeiam processos carcinogénicos relacionados com a inflamação, regulação do ciclo celular, resposta ao stress, diferenciação, apoptose e invasão [86-89]. Em contexto oncológico, os miRNAs estão alterados por mutações genéticas ou epigenéticas e são seleccionados os clones tumorais com vantagens aberrantes [86, 88]. Quando activos, os

miRNAs maduros emparelham transitoriamente com uma pequena sequência alvo – *seed region* – no mRNA transcripto, geralmente situada na 3' UTR (*untranslated region*), onde forma um complexo silenciador induzido por RNA [75, 86]. O emparelhamento total entre os miRNA e o mRNA complementar dá origem à clivagem do mRNA pela AGO2 com inibição da síntese proteica, permitindo que cada miRNA possa inibir centenas de RNA mensageiros [75, 86, 87]. Já o emparelhamento imperfeito causa a diminuição da tradução [86]. As células tumorais têm 3'UTR mais curtos do que as células normais devido a um local alternativo de poliadenilação e clivagem carecendo de alguns, ou de todos, os locais-alvo para a acção dos miRNA, o que facilita a translação de oncogenes e a transformação neoplásica [86]. De notar que os mecanismos epigenéticos no contexto carcinogénico podem silenciar ou activar os miRNAs [77, 82]. Em alguns estudos observou-se que há miRNA com acção anti-tumoral e outros com efeito oposto [86]. Se sobre-expressos, podem inactivar os genes supressores tumorais, e se ausentes podem permitir a expressão de proteínas oncogénicas [86], sendo reconhecidos como miRNAs oncogénicos e miRNAs supressores tumorais [90].

Os tumores têm perfis próprios de expressão de miRNAs [87, 91]. Os miRNAs com regiões de emparelhamento iguais são agrupados em famílias, e dentre estas, as mais relevantes são: a família let-7, paradigmática na categoria de miRNA supressores por regular o oncogene *RAS* [91], verificando-se que em neoplasias malignas da mama a sua expressão está ausente e, quando presente, relaciona-se com tumores de baixo-grau, ER-positivos e luminais A [86]; a transcrição da família miR-34, aumentada pelo gene *p53* e que regula um conjunto de genes envolvidos na proliferação celular e apoptose, incluindo o *Bcl-2* [86]; a família miRNA-125b, que está diminuída em tumores de mama já que impede o crescimento celular e favorece a apoptose [86]; a família miRNA-200, supressora da via de EMT [85, 86, 91, 92]; a família miRNA-205, limitada ao epitélio basal e que diminui drasticamente a sua expressão em fases iniciais da progressão tumoral [86]; a família miRNA-10 está amplificada em tumores luminais ER-positivos [86, 91]; a família miRNA-21, amplificada em estadios avançados da doença oncológica [86, 91]; a família miRNA-17-92, que impede a proliferação celular de cancro de mama e está amplificada nos tumores de mama de grau elevado [86, 91]. O papel crítico dos miRNAs na oncogénese e a sua expressão específica na doença confere-lhes potencial enquanto biomarcador e também como alvo no desenvolvimento de novas terapêuticas [87, 91]. Longos RNAs não codificantes (*long non-coding RNA*, lncRNA), de localização exclusivamente nuclear e compostos por mais de 200 nucleótidos entrelaçados e poliadenilados, regulam processos epigenéticos importantes para a manutenção do estado estaminal e para a diferenciação [77]. Por outro lado, RNA não codificante intergénico longo (*long intergenic non-coding RNA*, lincRNA) foi identificado em regiões intergénicas de DNA não codificador de proteínas e associa-se a complexos de remodelação da cromatina, necessários para a diferenciação e pluripotencialidade celular [77]. Outra classe de RNA não codificante diz respeito às regiões ultraconservadas de transcrição que têm assinaturas muito próprias em alguns tumores, embora o seu modo específico de acção ainda não seja totalmente conhecido [77].

Em todo o funcionamento celular a homeostasia depende do equilíbrio entre as enzimas cinases e proteases [93]. A fosforilação pelas proteínas cinase pode activar ou inactivar proteases envolvidas na manutenção da aderência intercelular como as metaloproteinases, enzimas do ciclo celular como as ciclases cinase-dependentes e caspases, relacionadas com a sobrevivência celular, e outras enzimas da proliferação, invasão celular e metastização [93, 94]. Os factores de crescimento são polipeptídeos que, na sua maioria, se

ligam a receptores da superfície membranar com domínios intracelulares de tirosina cinase [60, 93-95]. Estes, por sua vez, estimulam vias de sinalização intracelular como a proteína cinase activadora da mitose, a fosfatidilinositol 3-cinase (*phosphatidylinositol 3-kinase*, Pi3k), a fosfolipase C- γ e factores de transcrição como sinais de transdução e activadores da transcrição [94]. Estas vias estão presentes na progressão do ciclo celular, no crescimento celular, sobrevivência, metabolismo, apoptose e metastização [60, 94]. Os factores de crescimento epidérmico (*epidermal growth factors*, EGF) ligam-se a receptores tirosina cinase ErbB/EGFR, também denominados de HER, e, através de sinalização intracelular, regulam o programa de transcrição. A sua mutação, amplificação e desregulação estão presentes em muitos tumores de mama [94]. O factor de crescimento tipo-insulina tem um efeito anabólico e a sua via de sinalização está intacta ou amplificada nos tumores, gerando potentes sinais anti-apoptóticos [94]. A família de factores de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelium growth factor*, VEGF) controla a angiogénese através da sinalização por intermediários como a proteína cinase C, que regula a proliferação celular e a vasopermeabilidade, e a via AKT e MAKT, que regulam a sobrevivência e a proliferação [94]. O VEGF também recruta células derivadas da medula óssea implicadas na formação de nichos metastásicos [94].

As vias de sinalização relacionadas com a oncogénese são sumariamente as seguintes: (1) a proteína supressora tumoral retinoblastoma, pRB, que regula o ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S, por inibição do factor de transcrição E2F, um activador da expressão de genes relacionados com a mitose para além de, na ausência de p53, acelerar a perda de heterozigotia e participar na formação de tumores [44, 96]; (2) as vias de sinalização que regulam a auto-renovação das células estaminais normais estão muito activadas nas CSCs, incluindo a via Wnt, a via *Notch* e a via *Hedgehog* (Hh), relacionadas com a recapitulação da organogénese embrionária e com o desenvolvimento de neoplasias [97]. A via de sinalização Wnt é crítica na renovação das células estaminais, bem como na sua sobrevivência e diferenciação. Mais ainda, participa na homeostasia da mama, pelo que, em muitas neoplasias desta glândula a via Wnt está desregulada e contribui para a aceleração da tumorigénese e promoção de instabilidade cromossómica [96]. A via *Notch* está envolvida na regulação da sobrevivência e proliferação celular enquanto a via Hh se relaciona com o desenvolvimento da glândula mamária desde a embriogénese até à formação de alvéolos [97]; (3) a alteração da sinalização pelo oncogene *Ras* mutado induz a célula a um estado de proliferação continuada [96]; (4) o factor de transformação do crescimento- β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) que, em condições fisiológicas previne as células epiteliais de progredirem no ciclo celular e ainda estimula a apoptose e a diferenciação, durante a oncogénese, devido a alterações genéticas e epigenéticas, o TGF- β converte-se num promotor tumoral com propriedades pró-angiogénicas e metastásicas [44, 94]; (5) a via de sinalização mediada pelo factor nuclear-kappa B (*nuclear factor-kB*, NF-kB) activa a transcrição de genes envolvidos na resposta imunitária, inflamatória e anti-apoptótica, sendo que muitos tumores têm mutações nesta mesma via [96, 98].

As vantagens que estas vias de sinalização conferem às células tumorais passam pela aquisição de auto-suficiência em factores de crescimento e pela sustentabilidade da proliferação crónica [44, 60]. Para tal produzem e libertam factores de crescimento que estimulam os seus próprios receptores membranares – sinalização autócrina – ou os receptores das células próximas – sinalização parácrina, ou podem ainda, alterar o número, estrutura ou função dos receptores dos factores de crescimento, localizados na sua superfície, de

forma a aumentarem a probabilidade de activação e sinalização intracelular até ao núcleo, mesmo na ausência do ligando. Mais, a disfunção dos mecanismos de retrocontrolo negativo da via de sinalização inibidora do receptor do factor de crescimento permite-lhes ter uma via da proliferação sempre activa [44, 60, 94]. Um outro método de proliferação crónica baseia-se nas mutações activadoras de vias adicionais de transdução de sinal que radiam dos receptores de factores de crescimento [60]. O excesso de sinais de proliferação pode ser contraproducente por induzir a senescência e/ou apoptose da célula, pelo que, a relativa intensidade de sinalização oncogénica parece representar um compromisso entre a estimulação mitogénica máxima e as defesas antiproliferativas [60]. De forma alternativa, algumas células tumorais podem adaptar-se a elevados níveis de sinalização oncogénica através do bloqueio dos circuitos de indução de apoptose e senescência [60].

Os sinais de anti-crescimento induzem à quiescência celular, estado G₀ do ciclo celular, ou induzem a diferenciação terminal o que as torna incapazes de regressar à actividade mitótica [44, 60]. A sinalização de anti-crescimento é mediada por ligandos como o TGF- β , pRB, ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) e inibidores de CDKs [44, 60]. A evasão aos mecanismos de inibição por contacto é o resultado da mutação do gene supressor tumoral *NF2* e da proteína *merlin* que, em situações normais, medeia a inibição por contacto ao ligar-se a moléculas de adesão da superfície membranar, por exemplo a E-caderina, e a receptores transmembranares de tirosina cinase aumentando assim a adesividade intercelular [60]. A *merlin* tem ainda a função de sequestrar factores de crescimento e limitar esses sinais mitóticos [60]. Um segundo mecanismo de evasão à inibição por contacto é através da mutação do gene supressor tumoral *LKB1*, identificada em diversos tumores, em que o produto normal deste gene, a proteína polarizada LKB1, organiza a estrutura epitelial e ajuda a manter a integridade dos tecidos [60].

A instabilidade genómica, que reflecte as alterações dinâmicas do genoma, é de dois tipos: instabilidade microssatélite, que afecta a estrutura da cromatina e a expressão de genes e a instabilidade cromossómica, responsável pela aneuploidia e translocação [63]. Quando agentes genotóxicos, de origem interna ou externa, causam substituição de uma base de DNA, formam-se dímeros de pirimidina, quebras de uma cadeia ou das duas cadeias da molécula de DNA, ligações covalentes entre bases da mesma cadeia ou de cadeias diferentes, formação de adutos, entre outros eventos modificadores do genoma [46]. O termo instabilidade genómica é muito genérico e compreende também a instabilidade nucleotídica devida, sobretudo, à degradação dos sistemas de reparação de DNA, como a reparação por excisão de nucleótido e a reparação por excisão de base [63].

Os mecanismos de reparação do DNA são regulados ao nível translacional e pós-translacional onde os micro RNAs e o p53 participam através de mecanismos ainda pouco esclarecidos [88, 89]. Os mecanismos de manutenção da integridade cromossómica são basicamente de duas categorias: (A) fidelidade na replicação do DNA que inclui (i) vias de reparação de DNA responsáveis pela manutenção intacta de genes e do genoma e (ii) vias de modificação da epigenética da cromatina; (B) vias de divisão celular com manutenção da estabilidade mitótica e integridade cromossómica, que inclui vias implicadas (i) na estabilização do telómero e do centrómero, (ii) nos defeitos de proteínas e cinases de regulação do ciclo celular, (iii) na regulação das proteínas por modificação pós-translacional pela via da ubiquitina, (iv) na coesão da cromátide irmã e segregação do cromossoma e (v) na duplicação do centrómero [63]. Os mecanismo de reparação do DNA por

recombinação homóloga e não homóloga e reparação da incompatibilidade são bem conservados na evolução das espécies [46, 63, 99]. As proteínas que sinalizam a presença desses erros são a família tipo fosfatidilinositol 3-cinase (*phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinases*, PIKKs) — ATM, ATR e DNA-PK — e membros da família *poly(ADP)ribose polymerase* (PARP) [46, 99]. A ATM e DNA-PK são activadas por lesões do DNA com quebra das duas cadeias da molécula [46, 99]. As PARP1 e PARP2 são activadas pela quebra de uma ou ambas as cadeias do DNA [46, 99]. As proteínas ATR e ATM activam as cinases de pontos de controlo 1 e 2 (*checkpoint*, CHK), CHK1 e CHK2, que por sua vez, activam a p53 [46, 99]. A p53 direcciona a célula para um de três mecanismos bloqueadores de transformação neoplásica: activação de paragem temporária do ciclo celular na fase G1 – quiescência –, indução de paragem permanente do ciclo celular – senescência – e activação da morte celular programada - apoptose (Figura 12) [47, 49]. A quiescência permite que sejam expressos genes envolvidos na reparação das alterações de DNA para que o ciclo celular possa prosseguir para a fase S de replicação sem erros no genoma [49]. Durante a carcinogénese, a diminuição de p53, ao não desencadear os estados de quiescência, senescência ou apoptose, potencia a acumulação de mutações e a continuidade da multiplicação celular [49, 63, 96, 99, 100].

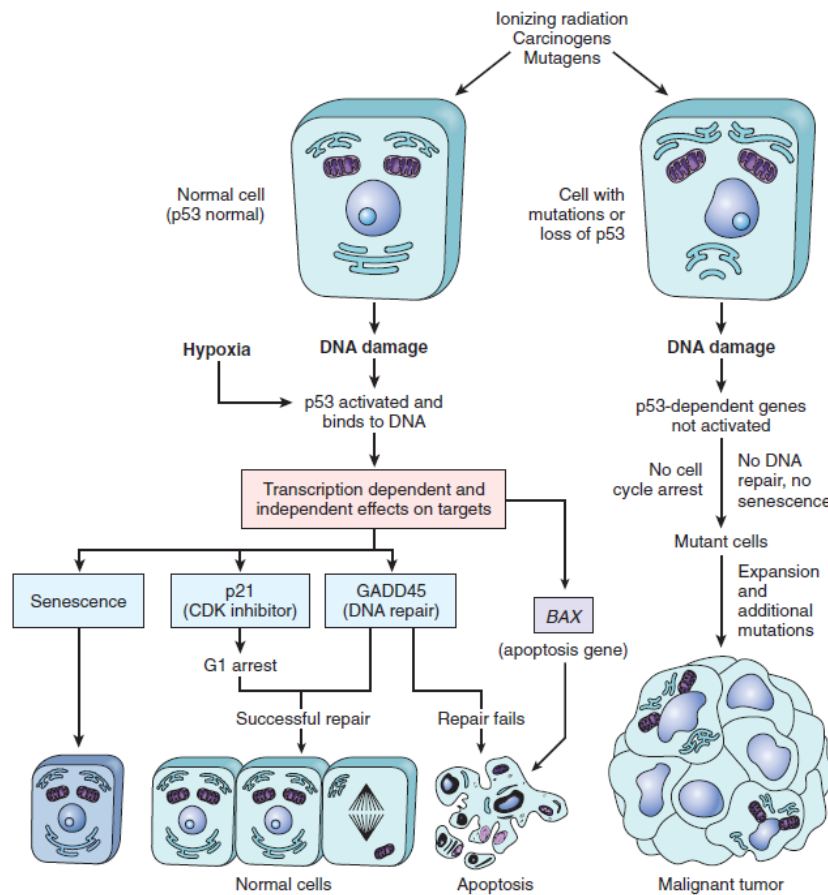


Figura 12 – As funções da p53 na manutenção da integridade do genoma. A activação da p53 normal por agentes genotóxicos ou por hipóxia induz a paragem do ciclo celular em G1 e a reparação do DNA por aumento de inibidores das cinases dependentes da ciclina como o p21. A reparação bem-sucedida do DNA permite que a célula retome o ciclo celular com normalidade. Se a reparação do DNA falhar o p53 activa a apoptose ou o estado de senescência. Nas células com mutação do p53 não há activação da paragem do ciclo celular em G1 e a reparação mal sucedida do DNA permite que a célula continue a proliferar com alterações do genoma, dando origem a eventuais neoplasias. Adaptado de Stricker, 2013 [47].

Na maioria dos tumores sólidos há variabilidade intratumoral e intertumoral do cariótipo, o número de cromossomas é anormal (aneuploidia) bem como os rearranjos genómicos estruturais extensos, o que reflecte instabilidade cromossómica e, por conseguinte, de cariótipo [96]. Este tipo de instabilidade é uma característica identitária de neoplasias malignas e define-se como uma taxa elevada e persistente de ganhos ou perdas de cromossomas inteiros com diminuição da fidelidade mitótica [63, 96]. A instabilidade cromossómica é atribuída a erros decorrentes da mitose relacionados com as mutações *driver* das vias de sinalização oncogénica e é consensualmente considerada como um agente de emergência acelerada de mutações e novos fenótipos. Fica assim aumentada a probabilidade de desdiferenciação celular conducente a estados mais acentuados de malignidade [63, 96, 99]. Reconhecem-se quatro defeitos primários durante a mitose para explicar a instabilidade cromossómica. O primeiro é a diminuição do ponto de controlo do fuso mitótico, o segundo é a persistência de erros nas ligações entre os cromossomas e os microtúbulos, o terceiro é a presença de centrossomas supranumerários e o quarto relaciona-se com a geometria do centrómero [96]. Em conjunto, estas perturbações na replicação do DNA causam duplicação incompleta do genoma, aneuploidia, quebras nas cadeias de DNA, rereplicação do DNA por reiniciação da replicação, com consequente instabilidade e amplificação genética [99]. A heterogeneidade fenotípica que daqui advém confere às células neoplásicas uma grande capacidade de adaptação consoante a sua localização em áreas bem oxigenadas como a periferia tumoral ou em áreas em hipóxia mais comuns no centro, de tal modo que alguns tumores têm duas subpopulações de células simbióticas, divergentes na forma de gerar energia [60]: uma subpopulação, glucose-dependente que liberta lactato, localizada em áreas pouco vascularizadas do interior tumoral, e uma segunda subpopulação periférica que importa o lactato e o utiliza como fonte energética por utilização parcial no ciclo de Krebs [60].

Os estados de normoxia e hipóxia não são estáticos em tumores, havendo flutuações temporais e regionais decorrentes da instabilidade e organização caótica dos neovasos associados ao tumor [60]. A transição para a hipóxia requer a reprogramação do metabolismo energético celular de modo a suportar o crescimento contínuo e a evasão activa ao sistema imunitário [60, 62]. Há mais de 80 anos que Otto Heinrich Warburg demonstrou que as células tumorais podem ter actividade glicolítica na presença de oxigénio – glicólise aeróbia –, tendo ficado conhecido como efeito de *Warburg* [60, 62]. Esta mudança é muito menos eficiente na produção de ATP, quando comparada com a fosforilação oxidativa na mitocôndria, e requer o aumento acentuado de transportadores de glucose, GLUT1, para manter os seus níveis adequados no citoplasma [60]. Esta via está relacionada com a activação de oncogenes, como *RAS* e *MYC*, e com mutação de genes supressores tumorais, como o *TP53* [60]. O propósito da reprogramação metabólica ainda é alvo de debate, mas pensa-se que a produção de lactato torna o microambiente ácido, o que facilita a migração celular e a invasão [62].

Apesar de toda a plasticidade fenotípica, alguns mecanismos de sobrevivência e morte celular estão também presentes nos tumores. A senescência, por exemplo, é um estado irreversível de paragem do ciclo celular associado ao envelhecimento, à oncogénese e a doenças degenerativas [101]. As células no estado senescente caracterizam-se por aumento do volume celular, com citoplasma vacuolar, alterações da estrutura do núcleo com focos de heterocromatina, alterações da expressão génica e do processamento proteico e

alterações metabólicas, para além de se tornarem resistentes à apoptose [101, 102]. Já a quiescência é um estado não-replicativo reversível e metabolicamente activo [101]. O início da senescência deve-se ao encurtamento dos telómeros após cada ciclo mitótico, na ausência de uma telomerase funcional, o que limita o número de mitoses das células somáticas [63, 103]. A erosão do telómero pode ainda ocorrer devido danos no DNA, por agentes genotóxicos ou *stress* oxidativo, que activam vias de reparação apropriadas onde participam as cinases ATM/ATR com activação da p53 no sentido de orientar a célula para a senescência ou para a apoptose [46, 63, 104]. Telómeros são complexos nucleoproteicos especializados na extremidade dos cromossomas eucariotas funcionais, compostos por unidades repetidas de elementos hexanucleotídicos TTAGGG sendo que, a cada divisão celular, perdem um desses elementos, limitando o potencial mitótico da célula [58, 63, 102, 103]. A telomerase permite a regeneração do telómero após um ciclo celular, sendo esta uma característica das células embrionárias, das células germinativas e de algumas células hematopoiéticas adultas e está reprimida nas células somáticas normais [63, 103]. A maioria dos tumores tem telómeros mais curtos do que as células não-neoplásicas, permitindo que cromossomas possam recombinar e fundir-se, iniciando quebras cromossómicas ao acaso e formando inclusive cromossomas dicêntricos com aumento da instabilidade cromossómica [58, 63, 103]. Na maioria dos tumores malignos a telomerase está sobreexpressa, participando na resistência à senescência, apoptose e consequente imortalidade [58, 60, 63, 103, 104], sendo considerado um potencial biomarcador [58].

Por vezes, os oncogenes causam um insuficiente funcionamento da mitocôndria culminando num aumento de ROS, que interferem na fisiologia celular e induzem a senescência [101-103, 105]. A longo prazo este estado pode ter efeitos adversos por impedir a regeneração dos órgãos e pela produção e libertação de ROS, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e factores de crescimento, colectivamente denominados de fenótipo secretor associado à senescência [102, 106]. Os ROS lesionam o DNA genómico e o DNA telomérico causando a erosão do telómero, e estes efeitos contribuem para a activação da reparação do DNA e para a indução/manutenção da senescência. Os ROS e a senescência geram um ciclo auto-alimentado desde que haja integridade das vias supressoras tumorais, Rb, p53 e p16, o que mantém a activação contínua das vias de reparação de DNA [101, 102, 105].

Como já foi referido, em células normais, quando as alterações de DNA excedem a capacidade de reparação, a apoptose ou morte celular programada pode ser activada, evitando que as mutações sejam transmitidas às células filhas [44]. Outras formas de morte celular ocorrem aquando da perda das ligações célula-célula e célula-matriz, o que liberta as células no lúmen do órgão, por exemplo no ácido mamário, e aí passam por anoiquia, autofagia, entose ou necroptose (Figura 13) [107, 108].

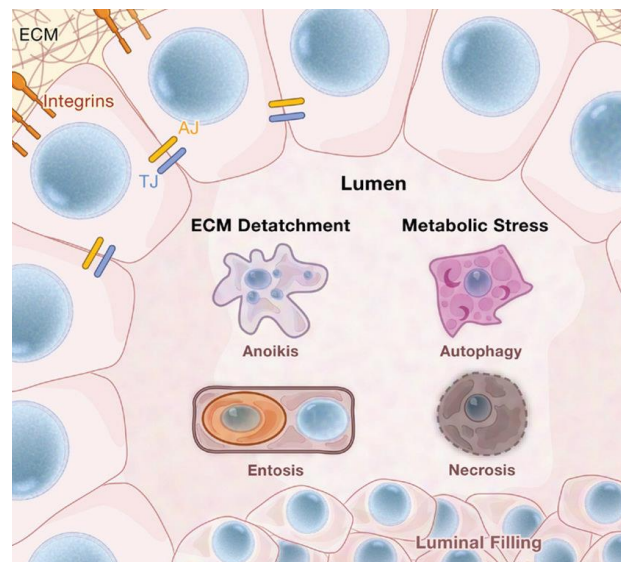


Figura 13 – No ácino mamário as células centrais em stress perdem uniões intercelulares e matriciais. Uma vez no lúmen, estas células entram em anóikis, autofagia, entose ou necrose programada – necroptose. Adaptado de White, 2007 [107].

A apoptose é uma importante barreira à carcinogénese sendo a sinalização intracelular composta pelas vias extrínseca e intrínseca, contudo em neoplasias malignas, a disfunção destas vias normais é muito comum (Figura 14 e Figura 15) [60, 61]. A via extrínseca começa com a ligação de sinais extracelulares ao receptor membranar de morte, pertencente à família do factor de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF), de que é exemplo Fas-ligando/Fas-receptor ou TNF- α , que activa a pró-caspase 8. A via intrínseca integra uma variedade de sinais de origem intracelular, como a p53, e activa a pró-caspase 9 [60, 61, 98]. Ambas as vias de sinalização da apoptose activam a caspase 3 que, por proteólise, origina a dissociação da célula e a formação de corpos apoptóticos formados por fragmentos de citoplasma com organitos muito condensados, com ou sem fragmentos nucleares, e envolvidos por membrana celular intacta [109]. Estes corpos são posteriormente fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas ou neoplásicas e degradados em fagolisossomas (Figura 14) [60, 61, 109].

Os inibidores da apoptose, como membros da família Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1, atuam por inibição de duas proteínas pró-apoptóticas – Bax e Bak –, estando esta última localizada na membrana mitocondrial externa [60, 61]. Em condições fisiológicas, quando as vias inibitórias da apoptose são desligadas, as proteínas Bax e Bak ficam activas, quebrando a membrana mitocondrial externa com libertação de proteínas pró-apoptóticas, como a citocromo c, o que activa uma cascata de caspases que culminam na via proteolítica [60]. As estratégias tumorais de evasão à apoptose passam pela perda do p53, pela mutação da caspase 8, pela diminuição dos factores pró-apoptóticos, pelo aumento dos sinais de sobrevivência e pelo aumento da expressão dos reguladores anti-apoptóticos [60, 61, 98, 110]. As células em apoptose estão normalmente isoladas, ou em pequenos grupos e são identificadas em microscopia de luz com coloração de hematoxilina e eosina (HE), por apresentarem forma redonda ou oval, com diminuição do volume celular, picnose, acidofilia citoplasmática, cariorréxis e presença de corpos apoptóticos [109]. Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo controlado e dependente de energia que não desencadeia inflamação, já que não há libertação de material intracelular para o meio extracelular e os corpos apoptóticos são prontamente fagocitados por células sem produção de citocinas inflamatórias [109].

A necrose é um processo incontrolado e passivo que geralmente afecta uma grande quantidade de células devido a processos que interferem com o fornecimento de energia ou com a integridade da membrana celular e manifesta-se por vacuolização citoplasmática [109]. Inicialmente começa por tumefacção celular ou oncose e evolui para a necrose propriamente dita com cariólise e lise [109, 111]. As células necróticas libertam a interleucina 2 (IL-2) que dá início ao processo inflamatório estimulando ainda directamente as células vizinhas a proliferar, facilitando potencialmente a angiogénese, a progressão do tumor e a invasão (Figura 15) [60, 109, 112]. A distinção histológica entre apoptose e necrose não é simples, sendo susceptível de erro, por isso é muito comum o recurso à imunohistoquímica utilizando anticorpos específicos de pró-caspases e caspases activas [109].

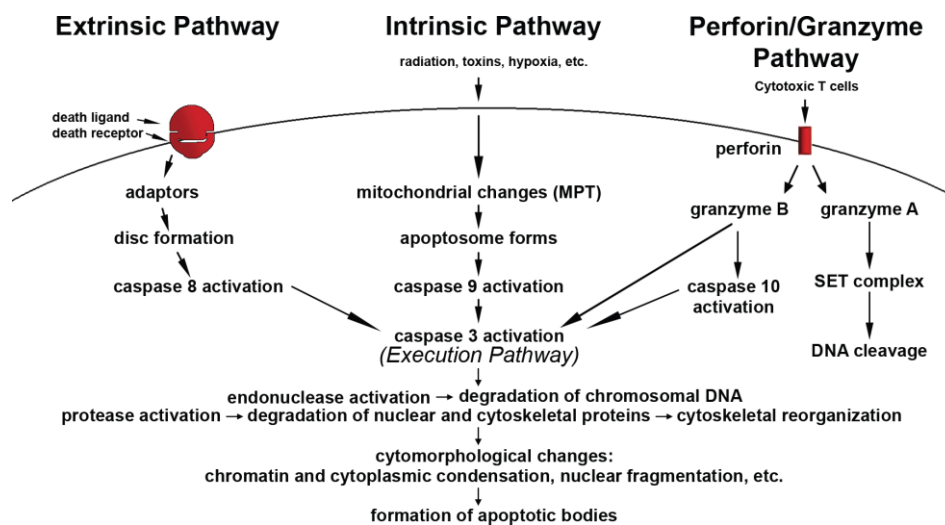


Figura 14 – Representação esquemática da apoptose. A apoptose é desencadeada pelas vias extrínseca e intrínseca, mas também pela via perforina/granzima. Cada via activa uma caspase específica, respectivamente, caspases 8, 9 e 10, seguindo-se a activação da caspase 3. As características citomorfológicas da apoptose são a diminuição do volume celular, a condensação da cromatina, a formação de vesículas citoplasmáticas e corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas adjacentes e células neoplásicas. Adaptado de Elmore, 2007 [109].

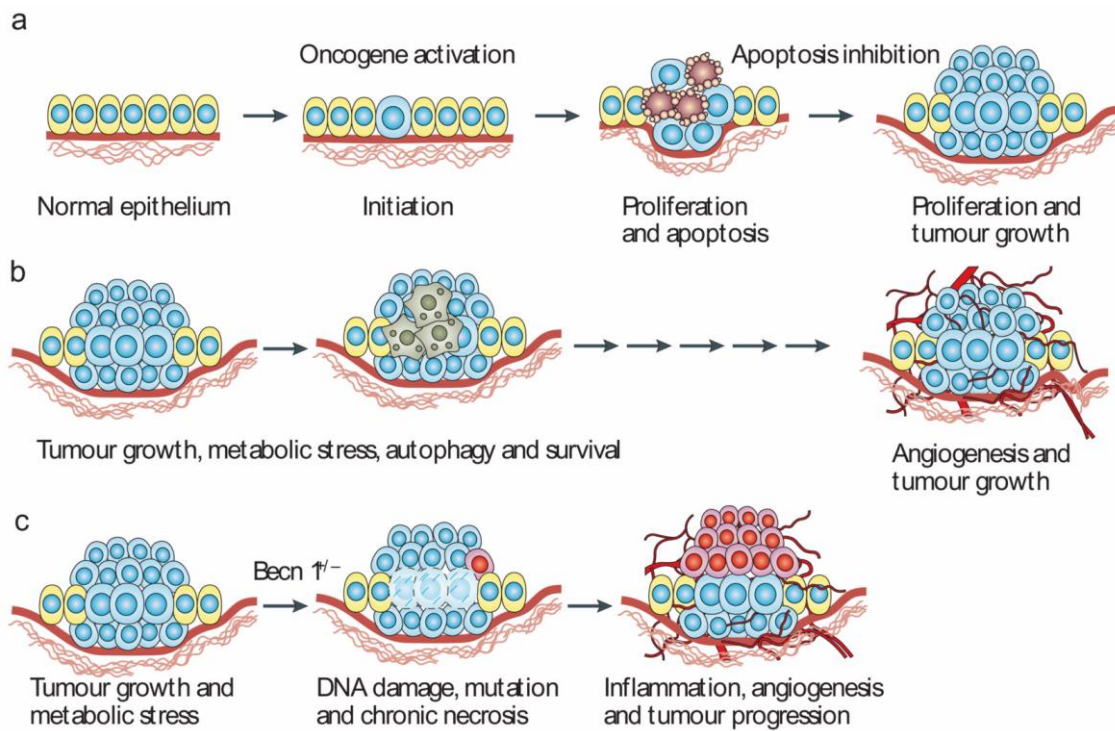


Figura 15 – A participação da apoptose, autofagia e necrose na oncogénese. a) As mutações da iniciação tumoral promovem a proliferação e a apoptose, o que limita a progressão activa de oncogenes, até que lesões genotóxicas adicionais inibam a apoptose e permitam o crescimento tumoral. b) O crescimento inicial do tumor sem perfusão sanguínea desencadeia hipóxia nas células centrais, autofagia e um estado de latência até que a angiogénese possibilite a retoma do pleno estado metabólico e o crescimento das células. c) Em tumores com alteração das vias de apoptose e autofagia, as células em *stress* metabólico entram em necrose com desencadeamento de inflamação, instabilidade genómica e angiogénese, favorecedoras do crescimento tumoral. Adaptado de [113]

A autofagia é um processo catabólico com importantes funções na homeostasia dos tecidos e na viabilidade de células sujeitas a *stress* [114-116], eliminando mitocôndrias disfuncionais, limitando os danos, removendo os agentes patogénicos intracelulares e participando na apresentação de antigénios [112, 117]. Ocorre em todas as células eucariotas e divide-se em quatro etapas: indução, formação do autofagossoma, fusão com o lisossoma ou vacúolo, a par de degradação do corpo autofágico, e reciclagem para biossíntese e metabolismo energético [60, 109, 114, 117]. A autofagia pode ser selectiva ou não selectiva [116] relativamente aos organitos a serem eliminados, partilhando vias comuns com a apoptose, sendo por essa razão considerada uma forma de morte celular programada [109, 114, 115]. Este processo tem um duplo e antagónico papel. Por um lado, a sua perda torna as células mais propensas à oncogénese, já que detêm maior instabilidade genómica e inflamação associada ao tumor [113, 114, 118], por outro, é um mecanismo de sobrevivência que recicla aminoácidos e diminui a necessidade de produção de ATP, o que é particularmente importante nas células tumorais com grande exigência metabólica, necessitando de reprogramar o metabolismo pela via *Warburg* (Figura 16) [112, 114, 118, 119].

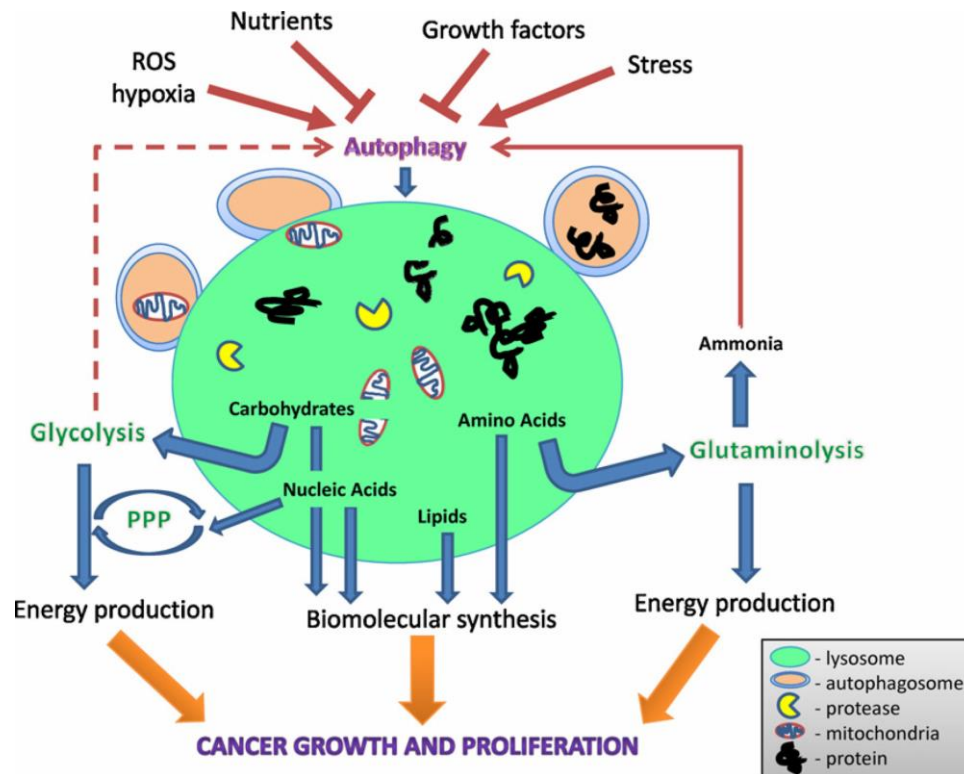


Figura 16 – O metabolismo do cancro e a autofagia. Os produtos da autofagia estão relacionados com a reprogramação metabólica. Os aminoácidos e carboidratos reciclados são usados na glicólise aeróbia e na via das pentoses (pentose phosphate pathway, PPP). A autofagia fica aumentada na presença de *stress* celular, ROS e hipóxia e torna-se diminuída quando a célula tem quantidades adequadas de nutrientes e factores de crescimento, o que forma um ciclo contínuo. Adaptado de [114].

A hipóxia é, entre outros, um importante factor de indução de autofagia em células neoplásicas que prolonga a sobrevivência celular, sendo no entanto, mais uma barreira à proliferação das células tumorais (Figura 15) [109, 114, 118, 119]. Paradoxalmente, a deficiência de nutrientes, a radioterapia e algumas drogas citotóxicas podem induzir elevados níveis de autofagia, o que estabelece um estado de dormência, aparentemente citoprotector, com prejuízo das acções citolíticas (Figura 17) [60, 112-114, 120]. A sua evolução no sentido da apoptose ou da sobrevivência celular depende de factores adicionais como o tecido de origem, a disponibilidade de nutrientes e a presença de oncogenes [112]. A modulação molecular da autofagia está a ser investigada visando da maximização terapêutica [113, 120, 121].

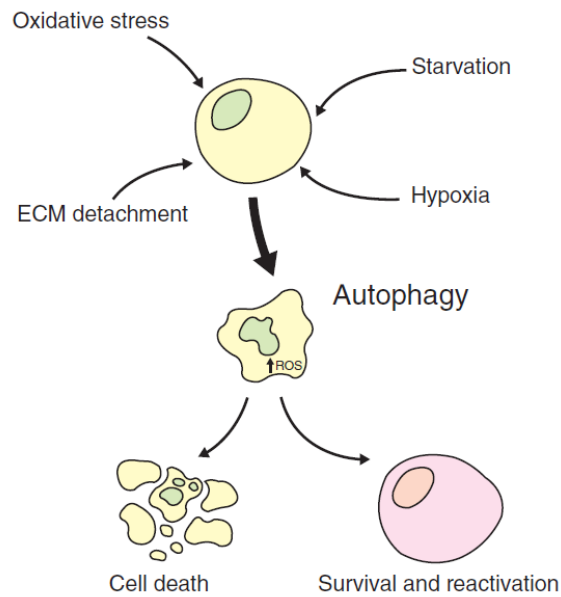


Figura 17 – A evolução da autofagia. Após a sua indução, o processo autofágico pode evoluir para apoptose ou para a sobrevivência da célula através da reactivação do ciclo celular. Adaptado de Guadamillas, 2011 [112].

Uma outra forma de morte celular programada por perda de adesão é a anoiquia, o que em Grego significa “sem casa”, e ocorre em células que se soltam da matriz extracelular [92, 108]. As vias de anoiquia e de apoptose são em tudo semelhantes, no entanto, as integrinas, como a FAK, activam sinais anti-apoptóticos e permitem uma activação independente de ligando de muitas vias de proliferação celular [92]. Também as caderinas, responsáveis pela adesão célula-célula emitem sinais de sobrevivência. Aquando do desprendimento de uma célula da sua matriz há uma enorme redução na produção de ATP, o que estimula o processo de autofagia como estratégia de evasão à apoptose, potenciando ainda a reversibilidade da actividade celular assim que a célula se volte a fixar em tecido conjuntivo [92, 108]. As células normais entram em anoiquia quando se desprendem da matriz extracelular, ao passo que as células neoplásicas desenvolvem mecanismos de resistência, o que lhes permite invadir e metastizar outros tecidos. A resistência à anoiquia é alcançada por uma mudança nas integrinas, por transição epitélio-mesenquimatosa, por activação de sinalização favorecedora da sobrevivência, por desregulação e adaptação do seu metabolismo, efeito *Warburg*, ou ainda por autofagia (Figura 18) [92, 108, 122].

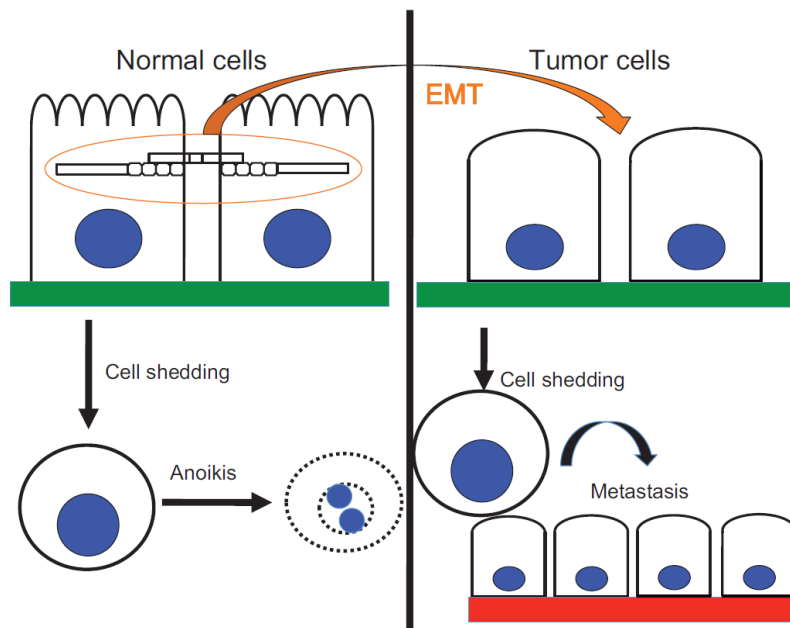


Figura 18 – A transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) no programa de resistência à anoquia. Em tecidos epiteliais não-neoplásicos, as células que se desprendem da matriz, anoiquia, entram em apoptose. As células neoplásicas que passam pela EMT libertam-se das adesões intercelulares e podem assim resistir à anoquia e metastatizar. Adaptado de Frisch, 2013 [122].

A entose é outro mecanismo que ocorre após o desprendimento de uma célula epitelial à sua matriz extracelular, em que uma célula viável invade uma célula vizinha e aí se mantém viva podendo até entrar em divisão e formar corpos multicelulares [108, 112]. Estas células internalizadas podem ser libertadas e reentrar na sua actividade normal, após a cessação dos estímulos stressantes, ou podem ser eliminadas na célula hospedeira por degradação lisossomal [108, 112]. A entose pode assim funcionar como um mecanismo citoprotector da célula neoplásica, mantendo a sua viabilidade e potencial oncogénico, por exemplo durante uma quimioterapia [112]. Por fim, a necroptose é uma necrose regulada que ocorre com activação da via extrínseca da apoptose e da caspase 8, com a participação de proteínas-cinase assumindo-se enquanto outra forma de morte celular após o desprendimento de uma célula à sua matriz [108, 111].

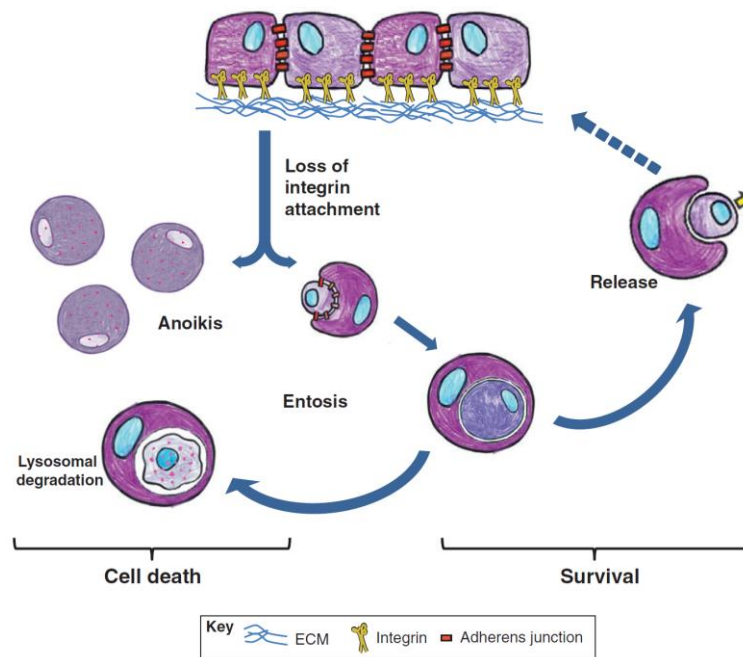


Figura 19 – A entose e a dupla evolução em morte celular ou sobrevivência. Quando uma célula epitelial se destaca da sua matriz, em vez de anoiquia, pode passar pelo processo de entose que é favorecido por forças associadas às junções de aderência. Neste estado intermediário, onde uma célula fica internalizada noutra célula, pode haver a sua eliminação por degradação lisossomal ou pode manter-se viável até à libertação e retorno da actividade com ancoragem na matriz conjuntiva. [112]

A dormência tumoral é mediada através de vários processos influenciados pelo microambiente onde a proliferação celular é equilibrada pela apoptose, pelo sistema imunitário ou pela ausência de perfusão sanguínea (Figura 20) [60, 123, 124].

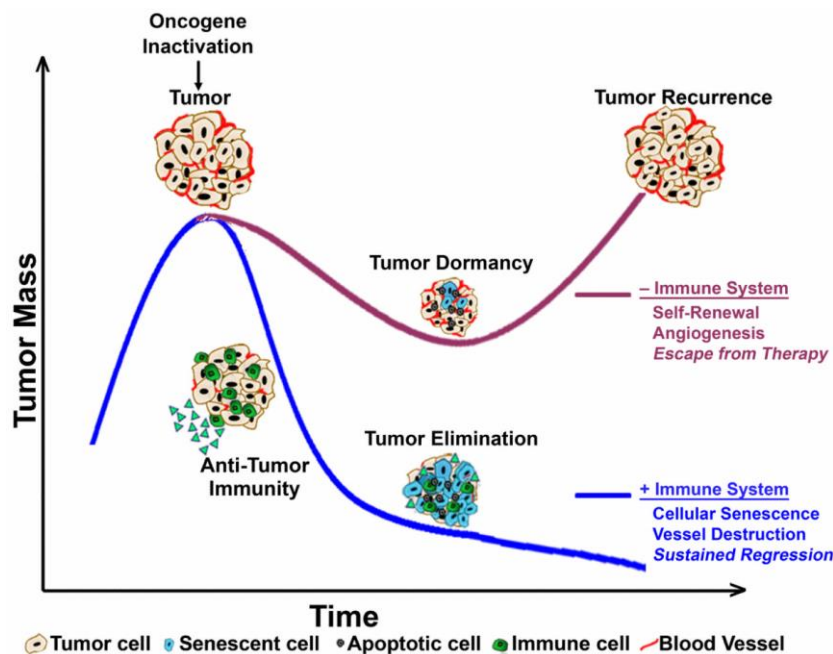


Figura 20 – A dormência tumoral versus eliminação tumoral é regulada pelo sistema imunitário funcional do hospedeiro. Adaptado de Bellocin, 2013 [123].

A dormência angiogénica acontece numa micrometástase avascular de reduzida dimensão, inferior a 1mm, limitada pela difusão de oxigénio a partir de capilares sanguíneos adjacentes [44, 60, 124]. A angiogénese marca a transição da dormência para a metástase de dimensão superior, onde a proliferação é maior relativamente à apoptose (Figura 15) [60, 124].

Actualmente reconhece-se que os tumores são constituídos por uma população heterogénea de células – parênquima – inserida num mesênquima que forma o estroma associado ao tumor ou também chamado de microambiente tumoral (*tumor microenvironment*, TME) [60, 125, 126]. O estado inflamatório associado a lesões pré-malignas, e sobretudo a actividade do sistema imune inato, confere ao TME moléculas bioactivas como factores de crescimento, factores de sobrevivência, factores angiogénicos, enzimas modificadoras da matriz facilitadoras da angiogénese, invasão e metastização, e sinais de activação da EMT, entre outros programas facilitadores da carcinogénese [60, 124, 126, 127]. Assim que surge a massa inicial de células neoplásicas instala-se uma inflamação associada ao tumor devido a factores intrínsecos das células transformadas ou à participação extrínseca das células inflamatórias hematopoiéticas, atraídas e activadas por factores quimiotácticos e pró-inflamatórios produzidos nas células tumorais e no TME [60, 125, 128].

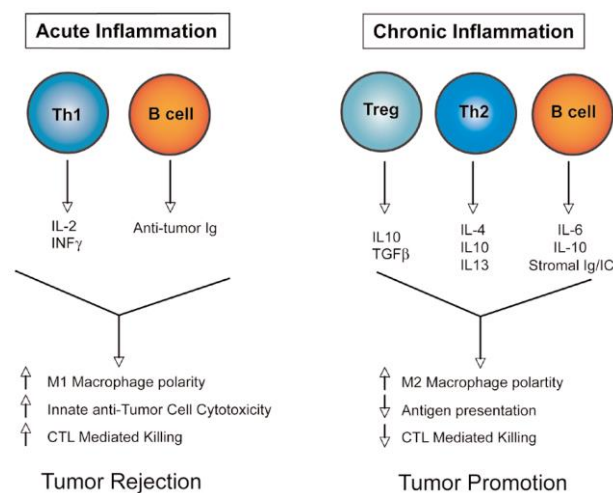


Figura 21 – As consequências da inflamação aguda e da inflamação crónica na biologia dos tumores. Na inflamação aguda, os LTh1 produzem citocinas antitumorais que, em combinação com a acção humoral dos LB, recrutam LT citotóxicos e contribuem para a rejeição do tumor. Na inflamação crónica os LTh2, os LB activados e os LTreg libertam factores favorecedores do crescimento como o $TGF\beta$, aumentam a resposta imune inata e inactivam os LT citotóxicos, favorecendo o crescimento tumoral. Adaptado de DeNardo, 2007 [129].

Os diferentes factores pró-inflamatórios e as diferentes células inflamatórias podem ter um efeito anti-tumoral ou um efeito de promoção tumoral (Figura 21) [106, 127, 128]. Em especial a inflamação crónica gera stress oxidativo e espécies reactivas de nitrogénio e de oxigénio que podem iniciar a carcinogénese por alteração da genética, da epigenética e da homeostasia das células e dos tecidos em direcção à malignidade [60, 124, 126, 128, 129]. Na inflamação aguda a apresentação de antígenos pelos macrófagos do subtipo M1 liga a imunidade inata com a imunidade adaptativa e permite a produção de anticorpos antitumorais, muito atractivos para as terapêuticas baseadas na imunidade [126, 128-131]. A imunossupressão decorrente da radioterapia e da quimioterapia tem por vezes efeitos contrários aos desejados, já que a eliminação da

imunovigilância permite a proliferação das CSCs remanescentes [130]. No entanto, é de realçar que os estados inflamatórios, bem como a actividade e diferenciação dos vários tipos celulares do estroma, são dinâmicos [126, 128, 129, 131].

O TNF aumenta a produção de óxido nítrico e activa factores de transcrição como o NF- κ B e o sinal de transdução e de activação da transcrição 3 (*signal transducer and activator of transcription*, STAT3) que interferem com muitos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, angiogénese e sobrevivência das células transformadas, bem como nos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteases e COX2 [98, 126, 128, 131, 132]. Paradoxalmente, a activação do STAT3 tem um profundo efeito anti-inflamatório, ao inibir a completa maturação dos macrófagos associados ao tumor (*tumor associated macrophages*, TAM) e a maturação das células dendríticas [132]. Também as células epiteliais e as CSC podem produzir uma variedade de citocinas inflamatórias e quimiocinas, metaloproteinasas e factores angiogénicos e de crescimento que contribuem para a migração e activação das células hematopoiéticas infiltradas, formando um ciclo pró-inflamatório auto-sustentado (Figura 22) [94, 106, 133]. O IFN- γ , produzido mais frequentemente por linfócitos T citotóxicos (CD8+) e linfócitos T auxiliares (CD4+), é reconhecido pelo efeito dominante na inibição tumoral. Por outro lado, a IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-23 são considerados maioritariamente favorecedores da promoção do tumor. Estas últimas são sintetizadas e libertadas principalmente por macrófagos associados ao tumor e por células supressoras derivadas da medula óssea [106].

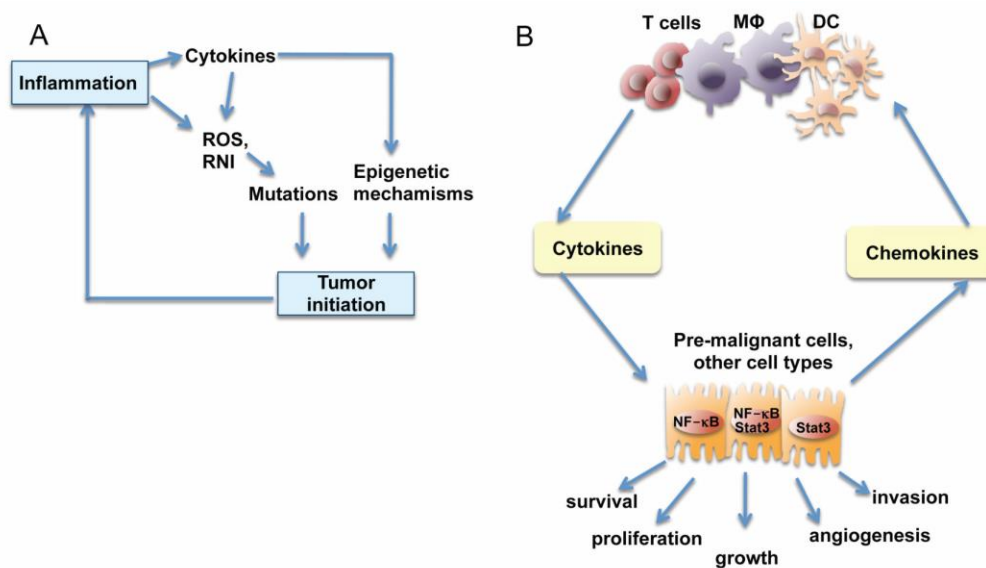


Figura 22 – A inflamação no desencadeamento da iniciação tumoral e na sua promoção. A) Iniciação tumoral. As espécies reactivas de oxigénio (*reactive oxygen species*, ROS) e as espécies intermediárias de nitrogénio (*reactive nitrogen intermediates*, RNI) causam mutações nas células adjacentes. Em células iniciadas as citocinas aumentam muito os níveis de ROS e RNI com agravamento da genotoxicidade e de epimutações. B) A promoção tumoral. Em células pré-malignas, as citocinas produzidas por células imunitárias infiltradas nos tumores activam factores de transcrição importantes como NF- κ B ou STAT3 com efeito vantajoso na sobrevivência, proliferação, crescimento e invasão e geram um ciclo inflamatório auto-sustentado. Adaptado de Grivennikov [128].

As células derivadas da medula óssea com participação no TME são TAMs, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, mastócitos e células supressoras derivadas da medula óssea [60, 124, 133]. Em conjunto produzem diferentes proteínas para a matriz extracelular, o que se apelida de “matrisoma”,

identificado por análise proteómica [124]. Os fagócitos, neutrófilos e macrófagos, dominam inicialmente a inflamação tumoral e, posteriormente, quando a inflamação se torna crónica e polarizada, são parcialmente substituídos por outras células incluindo linfócitos [133, 134]. Nesta fase mais tardia os macrófagos subtipo M2 promovem a invasão e a intravasão das células tumorais pela produção de EGF e colagénio fibrillar, o que acelera a motilidade das células neoplásicas e a remodelação proteolítica da matriz extracelular [60, 94, 124, 131]. Na Tabela 2 encontra-se uma breve descrição da influência ambivalente das células associadas aos tumores.

Tabela 2 – Síntese das células que constituem o microambiente tumoral e a dualidade das suas acções pró-oncogénicas e anti-oncogénicas. Adaptado de Hanahan, 2012; Fukuda, 2012; Grivennikov, 2010; Sansone, 2011; Castaño, 2012 [125, 128, 131, 133-135].

Tipo celular	Subtipo celular	Acção pró-oncogénica
		Acção anti-oncogénica
Células imunitárias infiltrativas	LTh2 CD4 ⁺ LTreg LB	Mitogénicos, recrutamento e activação de células mielóides, supressão de LTc Lise das células tumorais, directamente ou por interacção com os LTc. Produção de anticorpos pelos LB
	LT CD8 ⁺ (LTc) Células NK	Lise das células tumorais
	Macrófagos	M2: Pró-angiogénicos, linfangiogénicos, pró-invasivos, pró-metastásicos, supressores de LTc e de células NK, inibidores da apoptose, expandem as CSC e estimulam o EMT M1: Lise das células tumorais e apresentação de antígenos
	MDSCs Monócitos inflamatórios Células dendríticas	Pró-angiogénicos, pró-invasivos, pró-metastásicos, supressores de LTc e de células NK, expandem as CSC e estimulam o EMT
	Neutrófilos	Mutagénicos (produção de ROS), mitogénicos, recrutam IICs, pró-angiogénicos, pró-invasivos, pró-metastásicos Lise das células tumorais e anti-metastásicos.
	Mastócitos	Mitogénicos, recrutam IICs, pró-angiogénicos, pró-invasivos, pró-metastásicos, supressores de LTc e de células NK A quimase promove a inibição do tumor
	Plaquetas	Pró-metastásicas, pró-angiogénicas
	Células fibroblásticas associadas ao tumor	Miofibroblastos MSC
Fibroblastos tecidulares activados		Mitogénicos, pró-sobrevivência, pró-angiogénicos, recrutam e activam IICs, pró-invasivos, pró-metastásicos, suporte metabólico, expandem as CSC e estimulam o EMT Acções supressoras por activação incompleta dos fibroblastos
Adipócitos activados		Recrutam e activam IICs, suporte metabólico, pró-metastásicos, expandem as CSC e estimulam o EMT
Células endoteliais	Angiogénese, acção parácrina por factores tróficos, recrutam IICs, modulam a disseminação e metastização, limitam os LTc e NK	
Pericitos	Maduros e imaturos	Modulam a angiogénese, suportam a funcionalidade dos vasos sanguíneos

CSC, *Cancer stem cell*; EMT, *Epithelial-mesenchymal transition*; IICs, *Infiltrating immune cells*; LB, linfócitos B, LT, linfócitos T; MDSCs, *Myeloid-derived suppressor cells*; MSC, *Mesenchymal stem cell*; NK, *Natural Killer*; ROS, *Reactive oxygen species*.

Os mastócitos (*mast cells*, MC) são células grandes, entre 25-30 µm de diâmetro, com grânulos metacromáticos na coloração de azul de toluidina, e estão presentes em todos os tecidos vascularizados na proximidade de vasos sanguíneos, nervos, células musculares lisas, glândulas produtoras de muco e folículos pilosos [135-137]. Localizam-se em duas regiões, tecidos conjuntivos e interfaces corporais com o meio externo como pele, mucosa dos tractos gastrintestinal, respiratório e geniturinário [135]. A distribuição anatómica que adoptam em locais expostos a agentes etiológicos externos sugere que os mastócitos são “antenas imunológicas” em microambientes de interface [137]. Os seus grânulos são compostos por uma mistura de histamina, serotonina (em roedores), proteases, citocinas e factores de crescimento envolvidos por glicosaminoglicanos [135, 136]. As funções que classicamente lhes estão associadas relacionam-se com reacções alérgicas e respostas de protecção aos parasitas [135, 137]. Participam ainda no sistema imune inato e desencadeiam a resposta imunitária adaptativa por orquestrarem a chegada de células dendríticas, linfócitos T e B [135, 136].

Nos últimos anos novas funções foram identificadas, alargando o espectro de acção destas células que vão desde a modulação imunitária, angiogénese, cicatrização tecidual, neoplasias e desmoplasia [135, 136, 138, 139]. Alguns estudos sugerem que podem expressar moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC) das classes I e II, pelo que são também células apresentadoras de antígeno (*antigen presenting cells*, APCs) ou fazem parte da co-estimulação inflamatória [135]. Os mastócitos humanos são divididos em dois tipos, os que contêm triptase, MC_T, encontrados nas regiões de interface, associados ao sistema imune, em especial aos linfócitos T, e mastócitos com triptase e quimase, MCTC, mais presentes no tecido conjuntivo como no parênquima mamário [135, 136]. Em contexto carcinogénico a triptase activa metaloproteinases pré-formadas nos mastócitos e factores que promovem a angiogénese, estimulando o crescimento neoplásico e a remodelação da ECM, entre outras complexas influências imunitárias, inflamatórias e neoplásicas (Figura 23) [135]. Em neoplasias da mama, parece haver uma correlação positiva entre a presença de mastócitos e os tumores com fenótipos mais agressivos [139]. Curiosamente, as neoplasias da glândula mamária induzidas por 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) em rato estão associadas a grande quantidade de mastócitos resistentes à desgranulação, o que sugere que estes são incapazes de destruir os tumores ou que bloqueiam a desgranulação [139, 140]. Resultados semelhantes foram encontrados em biópsias de adenocarcinoma mamário em humanos [140].

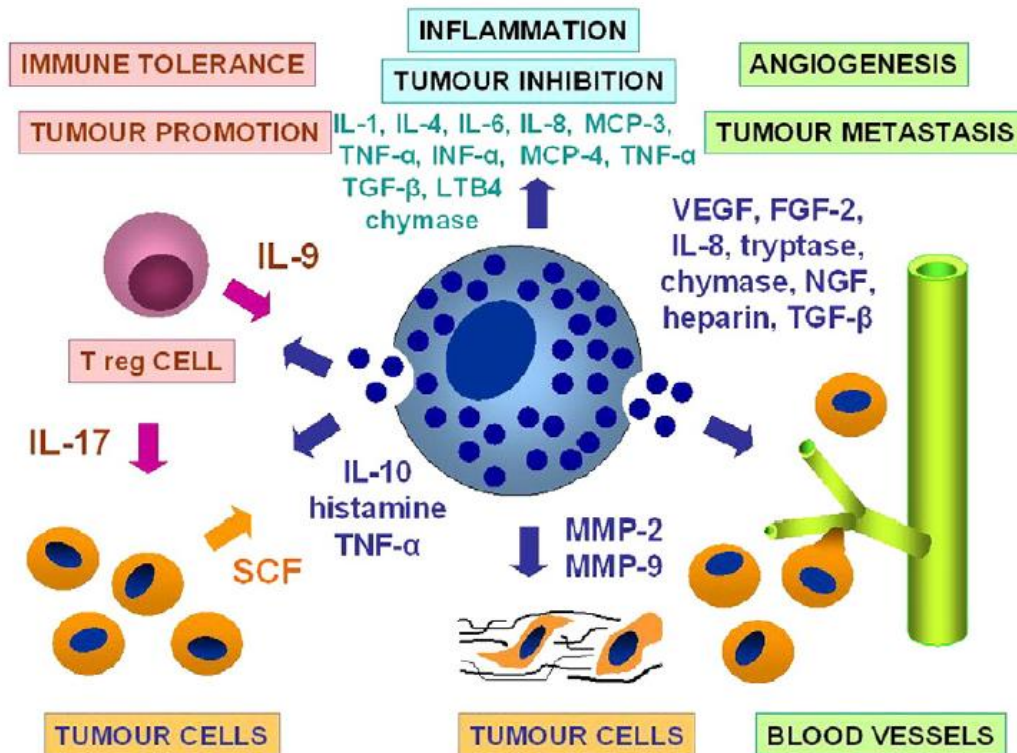


Figura 23 – Abordagem ilustrada das complexas sinalizações e alterações induzidas por mastócitos em tumores. As células tumorais produzem o factor de células estaminais (*stem cell factor*, SCF), atrativo para mastócitos que, por sua vez, produzem diversos factores angiogénicos e metaloproteinasas da matriz, como a MMP-2, promovendo vascularização tumoral e a invasão, respectivamente. Os mastócitos podem ainda gerar imunossupressão pela libertação de IL-10, histamina e factor de necrose tumoral- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) e, por outro lado, activar os linfócitos T reguladores que medeiam a imunotolerância e a promoção tumoral. Em oposição, os mastócitos podem promover inflamação e inibição do crescimento tumoral e apoptose das células neoplásicas pela libertação de quimase e interleucinas e citocinas relevantes, como o TNF- α . Adaptado de Ribatti, 2012 [135].

Os fibroblastos libertam, para as células tumorais, sinalização mediada por TGF- β e PDGF com estimulação da EMT e aquisição do fenótipo invasivo [124, 133]. Sugere-se, por essa razão, que os fenótipos muito malignos dependem, não só do genoma tumoral, mas também das interações entre as células, nomeadamente as CSCs e o seu estroma [60, 124, 133]. As interações entre o parênquima e o seu estroma variam, já que as células cancerosas presentes nas margens de alguns carcinomas passaram pela EMT, sugerindo que estão sujeitas a estímulos microambientais diferentes das células mais internas [60, 124, 141]. As margens do tumor, bem oxigenadas, são um importante ponto de encontro no TME entre células imunitárias angariadas e as células do estroma, muito activas e interactivas com as células neoplásicas [124, 133]. No centro do tumor a hipóxia é quimiotáctica para células imunitárias, como os TAM provenientes da periferia. Estes migram para a porção central onde secretam TGF- β e factores de crescimento da angiogénese [94, 124, 131, 133, 142]. A hipóxia está associada à progressão em direcção à malignidade e à metastização [143]. Nestas condições, as células centrais estão em acentuada pressão selectiva e as CSCs migram para a margem do tumor onde passam pela EMT sob influência do TME [124, 131, 133]. Os tipos celulares do microambiente tumoral são geneticamente estáveis e podem normalizar as células neoplásicas, abrindo a possibilidade de reeducar as células do estroma enquanto estratégia terapêutica [124, 126, 131, 133].

As neoplasias desenvolvem-se em ambientes tecidulares complexos dos quais dependem para um crescimento sustentado, invasão e metastização [124, 125]. Estas etapas são classicamente descritas em cascata, com início na invasão do estroma, seguindo-se a invasão vascular (intravasão) sanguínea ou linfática e circulação e saída subsequente das células neoplásicas do lúmen vascular (extravasão), formação de pequenos nódulos tumorais (micrometástases) e, por fim, o crescimento até tumores macroscópicos (colonização) (Figura 27) [60, 94, 108].

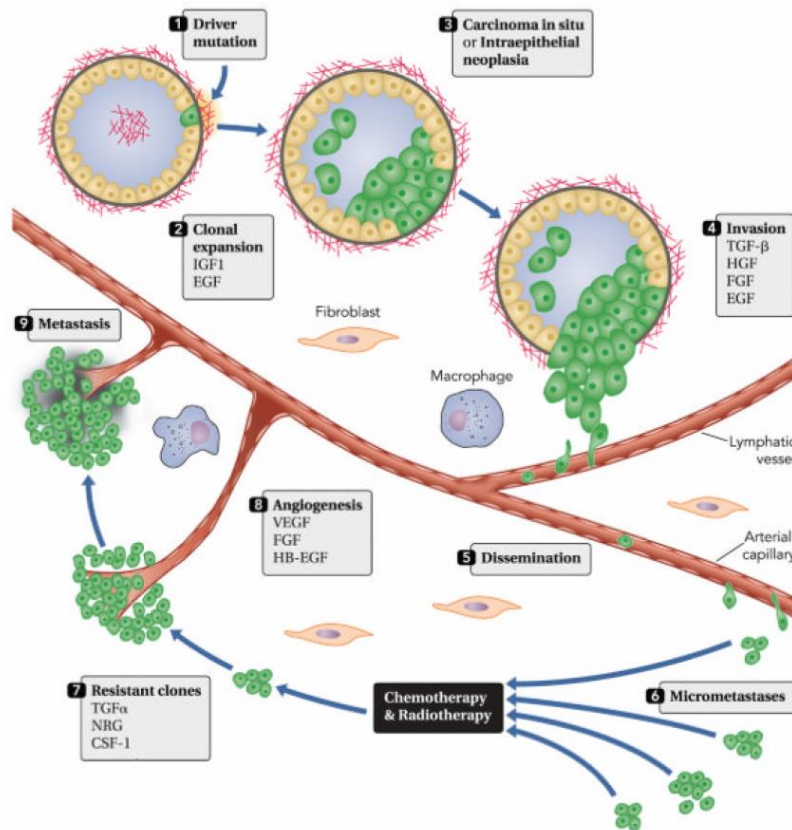


Figura 24 – Os factores de crescimento e as etapas da oncogénese. A célula mutada ou iniciada (1) expande-se (2) pela influência do EGF e IGF1 originando lesões intraluminais *in situ* (3). A fase de invasão (4) tumoral é influenciada por oncogenes, genes supressores tumorais e muitos factores de crescimento. A disseminação (5) associada à intravasão e extravasão das células neoplásicas em vasos sanguíneos e linfáticos forma micrometástases (6) e a aquisição de novas mutações produtoras de vias autócrinas de crescimento produzindo clones resistentes (7). A angiogénese (8) sustenta o crescimento das células e a formação de uma grande metástase (9). CSF-1, *colony stimulating factor 1*; EGF, *epidermal growth factor*; FGF, *fibroblasts growth factor*; HB-EGF, *heparin-binding EGF*; IGF1, *insulin growth factor*, NRG, *neuregulin*; TGF, *transforming growth factor*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. Adaptado de Witsch, 2010 [94].

A activação da invasão, intimamente relacionada com o programa EMT, é um processo fisiológico e permite às células epiteliais remodelarem o citoesqueleto e adquirirem mobilidade durante o processo de cicatrização, inflamação ou embriogénese (Figura 25) [92, 144, 145].

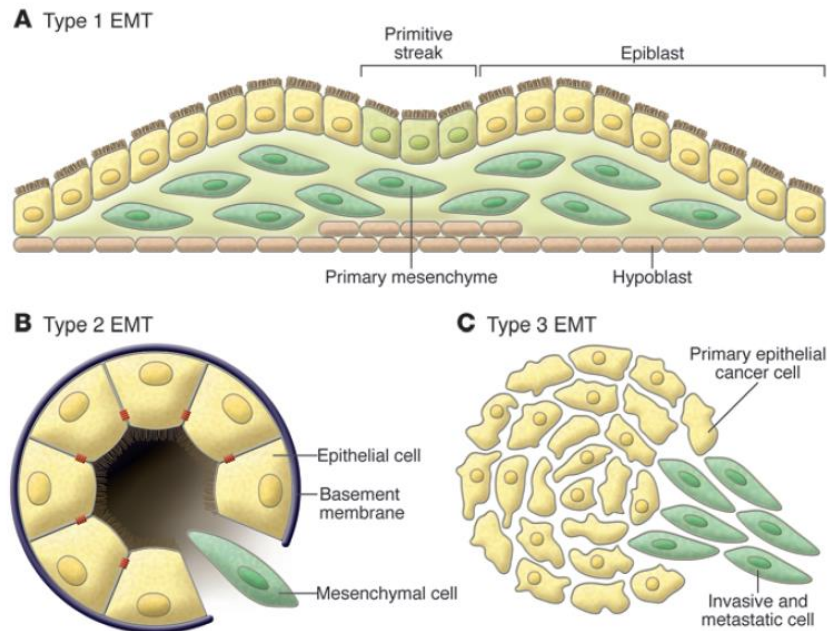


Figura 25 – Os diferentes tipos de transição epitélio-mesenquimatosa. (A) O tipo 1, está associado com a embriogénese. O epitélio primitivo origina o mesenquima primitivo e células bem diferenciadas do tecido conjuntivo como condrócitos, osteoblastos e mioblastos. (B) O tipo 2 está presente na inflamação e fibrose. (C) O tipo 3 ocorre em células epiteliais neoplásicas que, pela transição epitélio-mesenquimatosa, adquirem a capacidade de invadir e metastizar. Adaptado de Kalluri, 2009 [145].

A aquisição do fenótipo mesenquimatoso permite que as células associadas aos carcinomas progridam para graus maiores de malignidade. A perda das junções firmes, reorganização do citoesqueleto e repressão da expressão de moléculas-chave envolvidas na polaridade celular, como a E-caderina, são reconhecidas características das células epiteliais que passaram pela EMT [60, 94, 144, 146]. Pensa-se que os repressores da transcrição da E-caderina, como Snai1, Snai2, Twist, ZEB1 e ZEB2, também orquestram um programa mais vasto da EMT por regulação de genes envolvidos na remodelação da matriz extracelular, mudança da localização e função da β -catenina, permitindo a sua libertação do complexo membranar, que forma com a E-caderina, e a sua translocação para o núcleo onde activa genes com a MMP-7, α -actina do músculo liso e vimentina (Figura 26) [144]. A reorganização do citoesqueleto facilita a migração, e em especial a vimentina, que permite a aquisição de motilidade, alteração da morfologia celular de poligonal/epitelial para fusiforme/fibroblástica e invasão [60, 94, 124, 144]. Os factores de sinalização específicos para esta transição são complexos com envolvimento de muitas vias diferentes, incluindo a sinalização mediada por TGF- β , Wnt, Notch e Hedgehog [144]. O TGF- β 1 é um indutor prototípico do programa EMT. As proteínas morfogénicas de

osso (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), assim chamadas pela sua capacidade de induzir a formação óssea, são membros da superfamília TGF- β e também regulam muitos outros processos envolvidos na proliferação, diferenciação, apoptose e morfogénese [144]. As BMPs estão implicadas na indução de EMT, fibrose, desenvolvimento e progressão tumoral, em especial a BMP-2 [144].

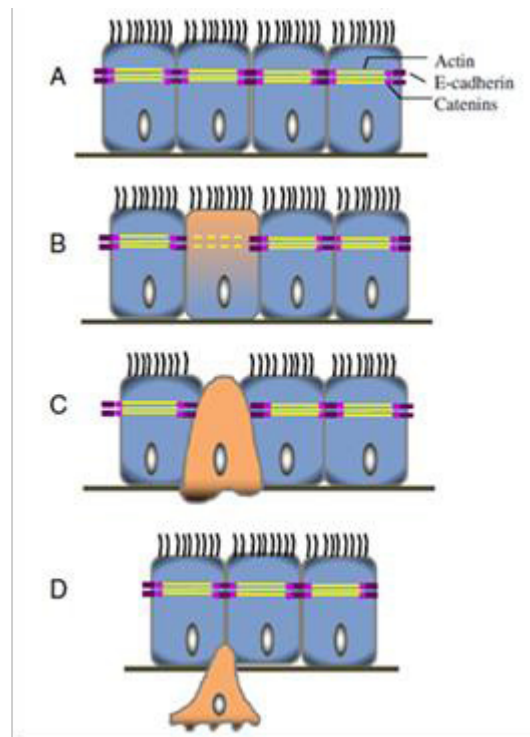


Figura 26 – Durante a transição epitélio-mesênquimatosa (*epithelial–mesenchymal transition*, EMT), as células epiteliais perdem muitas características específicas dos epitélios e adquirem fenótipos típicos de células mesênquimatosas. (A) e (B) Repressores da transcrição da E-caderina diminuem esta molécula de adesão entre células epiteliais, sendo este um evento-chave da EMT. A localização da β -catenina transfere-se do complexo membranar com a E-caderina para o citoplasma e depois para o núcleo onde activa os genes relacionados com o fenótipo mesênquimatoso como a α -actina de músculo liso e vimentina. (C) e (D) Como resultado das alterações decorrentes da EMT as células epiteliais são libertadas dos tecidos envolventes e podem tornar-se migratórias e invasivas. Adaptado de McCormack, 2013 [144].

Durante esta transição, as células tumorais, em especial as CSCs, activam vias epigenéticas de inibição de moléculas de adesão intercelular, permitindo-lhes a evasão à anoiquia e invadir e metastizar outros órgãos [58, 60, 92, 124]. O fenótipo mesênquimatoso recém-adquirido tem propriedades tipo-estaminal como auto-renovação, resistência à apoptose e expressão de enzimas que degradam a matriz, possibilitando os processos de invasão, migração e metastização [60, 62, 94, 124], tendo esta escassa eficiência já que apenas 0,01% das células que passam para a circulação são capazes de formar metástases [124].

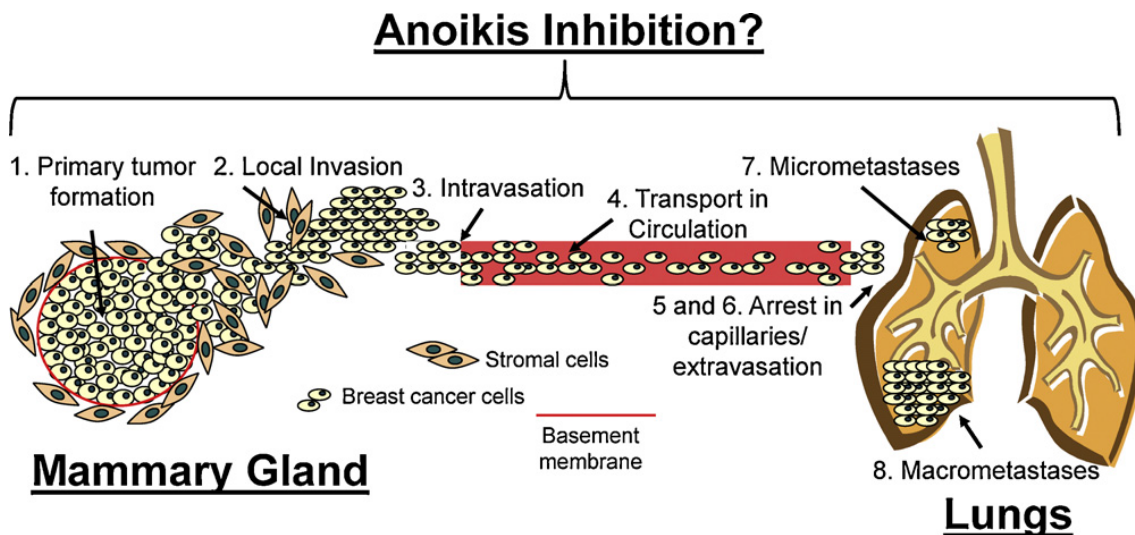


Figura 27 – As etapas de metastização de um tumor mamário incluem (1) a formação do tumor primário, (2) invasão local, (3) intravasão, (4) transporte na circulação, (5) aprisionamento nos capilares, (6) extravasão, (7) micrometástases e (8) macrometástases. A resistência à anoiquia é causada por instabilidade genética, hipóxia intratumoral, activação de transição epitélio-mesenquimatosa e expressão de marcadores estaminais, podendo estar implicada no processo de metastização. Adaptado de Paoli, 2013 e Buchheit, 2012 [92] e [108].

Parte dessa dificuldade prende-se com a diferença entre o TME do tumor primário e o TME encontrado pelas células da extravasão que, ao chegarem a um órgão distante, encontram um estroma normal [60, 124] [143]. Consequentemente muitos dos sinais heterotípicos presentes no local de origem estão ausentes nos locais de disseminação, constituindo uma barreira ao crescimento e implantação das células neoplásicas [60]. Assim, a sucessão de interações entre as células disseminadas e o estroma terá de ser repetida de modo a estabelecer-se uma metástase [60]. Alguns microambientes, por vários motivos, são propícios a suportar estas células [60]. Estes locais permissivos, referidos como “nicho metastático”, podem ser intrínsecos ao local de implantação ou estar pré-induzidos por factores libertados previamente pelo tumor primário [60, 143].

As células inflamatórias promotoras da carcinogénese são a componente mais bem documentada de indução destes nichos no entanto, outras células e a matriz extracelular terão certamente um papel importante neste contexto [60, 124, 147], mais detalhadamente as células tumorais que invadem os tecidos sintetizam factores de crescimento que, conjuntamente com macrófagos do centro do tumor, rompem a membrana basal dos vasos sanguíneos – intravasão [94, 124]. Uma vez na corrente sanguínea, as células tumorais são protegidas da acção das células NK por agregados plaquetários com fibrina e por exosomas derivados do tumor que aumentam a sobrevivência das células disseminadas [124, 148, 149]. Uma vez chegadas ao nicho pré-metastático, e quando as células do tumor primário libertaram VEGF, TGF- β e o factor de crescimento placentário, ocorre o aumento da expressão de quimiocinas inflamatórias S100 e amilóide sérico A, o que leva à ancoragem de células progenitoras hematopoiéticas derivadas da medula óssea [143]. Por sua vez estas células secretam factores pré-metastáticos, tais como o TNF- α , metaloproteinasas e TGF- β . Os fibroblastos activados secretam fibronectina, uma proteína de aderência importante no nicho, e lisol-oxidase que, em conjunto, modificam a matriz extracelular local e viabilizam a metastização [143, 147, 150]. Exosomas derivados do tumor primário [148, 149], integrinas locais de origem plaquetária e células endoteliais activadas

retraem o endotélio, permitindo o aumento da extravasão e a colonização do nicho e que constitui a micrometástase. As células neoplásicas podem conseqüentemente passar pelo processo inverso, ou seja pela transição mesenquimo-epitelial (*mesenchymal-epithelial transition*, MET), readquirindo o fenótipo epitelial original, importante no crescimento da metástase (Figura 28) [60, 124, 144]. A plasticidade entre o estado epitelial e o mesenquimatoso ocorre por influência do estroma circundante [60, 124]. O microambiente nos locais secundários pode ainda inibir activamente a sobrevivência e o crescimento das células metastásicas, por exemplo pela acção citolítica dos neutrófilos [124], ou pode induzir as micrometástases ao estado de dormência assintomática durante muito tempo, até que a angiogénese permita a actividade metabólica e a proliferação celular [124, 128, 143].

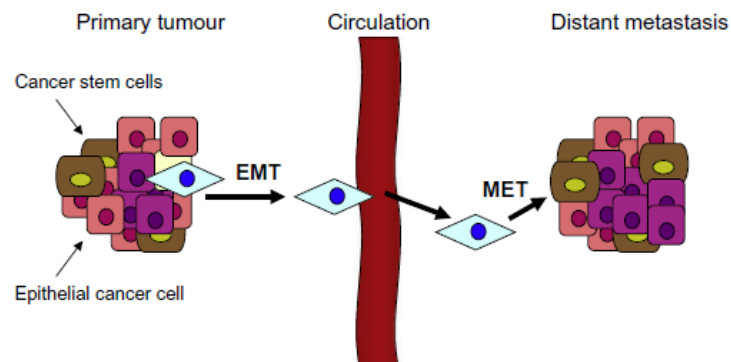


Figura 28 – A plasticidade entre a transição epitélio-mesenquimatosa (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) e a transição mesenquimo-epitelial (*mesenchymal-epithelial transition*, MET) no processo de metastização. Adaptado de, Pang, 2010 [58].

Em tecidos normais, a perfusão sanguínea é mantida por uma rede vascular ordenada e eficiente [124, 151] regulada pelo equilíbrio entre as moléculas pró-angiogénicas e anti-angiogénicas dependentes do metabolismo (Tabela 3) [151]. A microarquitECTURA resultante da rede vascular é hierarquicamente organizada com vasos bem diferenciados que permitem a perfusão sanguínea com oxigénio e outros nutrientes a todas as células [124, 151]. Durante a embriogénese o desenvolvimento da vascularização envolve células endoteliais organizadas em tubos – vasculogénese – e a ramificação de vasos já existentes – angiogénese [60, 94].

Tabela 3 – Factores pró-angiogénicos e anti-angiogénicos. Adaptado de Harrington, 2011 [44].

Factores pró-angiogénicos	Factores anti-angiogénicos
Factor de crescimento do endotélio vascular, VEGF	
Factor alcalino de crescimento de fibroblastos, bFGF	Angiostatina
Factor ácido de crescimento de fibroblastos, aFGF	Endostatina
Factor transformador do crescimento- α , TGF- α	Trombospondina 1 e 2, TSP-1, TSP-2
Factor transformador do crescimento- β , TGF- β	Interleucinas, IL-1b, IL-12, IL-18
Factor de crescimento derivado das plaquetas, PDGF	Antitrombina III
Factor de necrose tumoral- α , TNF- α	

PDGF, *platelet-derived growth factor*; aFGF, *acid fibroblast growth factor*; bFGF, *basic fibroblast growth factor*; TGF- α , *transforming growth factors- α* ; TGF- β , *transforming growth factors- β* ; TNF, *tumor necrosis factor- α* .

À semelhança dos tecidos normais, os tumores crescem na dependência de vasos sanguíneos para adquirirem nutrientes e oxigénio e para eliminarem produtos do metabolismo e dióxido de carbono [60, 62, 152]. Acontece que a difusão directa de oxigénio e nutrientes é eficaz apenas para um pequeno grupo de célula tumorais com 60 a 100 μm , após esta dimensão, a hipóxia do tumor tem de estimular a sua própria vascularização [44]. Daí que a angiogénese ocorra numa fase muito precoce do desenvolvimento tumoral e permaneça activa durante a fase de progressão, tornando-se um elemento identitário das neoplasias [60, 124]. As estratégias tumorais para a obtenção de oxigénio e nutrientes são várias: vasculogénese, angiogénese, crescimento tumoral ao longo de uma vaso pré-existente, invaginação septal para vasos pré-existentes – intussuscepção – e/ou mímica vascular, ou seja células tumorais que mimetizam as células endoteliais [62, 94]. Em alguns tumores, oncogenes dominantes, como *Ras* e *Myc*, podem estimular a expressão de factores angiogénicos enquanto noutros tumores os sinais indutores são produzidos indirectamente por células inflamatórias [60, 124].

Os tumores apresentam padrões muito diferentes de neovascularização existindo tumores hipovascularizados e outros densamente vascularizados [60]. Para que a angiogénese tenha sucesso, é essencial a cooperação entre múltiplas células do TME sensíveis à hipóxia como células endoteliais vasculares, pericitos, macrófagos, fibroblastos, células mesenquimatosas estaminais e células precursoras derivadas da medula óssea, normalmente em localização peri-tumoral [60, 124, 153]. A hipóxia estimula a sobreexpressão associada a factores pró-angiogénicos, como o VEGF, produzido em grande quantidade por CSCs [151, 154], angiopoietina e factor de crescimento dos fibroblastos ou, por outro lado, a inibição da produção de proteínas anti-angiogénicas como a trombospondina [44, 60]. Os pericitos são células relativamente indiferenciadas, dotadas de grande plasticidade, convertendo-se bidireccionalmente em miócitos vasculares, miofibroblastos e fibroblastos sob efeito do VEGF e do PDGF [60, 153]. Nos tumores, os pericitos estão pouco associados aos microvasos e adoptam a forma estrelada com prolongamentos que se infiltram no parênquima tumoral actuando de forma concertada com os endoteliócitos durante a angiogénese e a quiescência [153]. Os defeitos nos endoteliócitos e nos pericitos causam as aberrações circulatórias nos tumores [153]. Assim, a neovasculatura emergente é composta por vasos sanguíneos imaturos, tortuosos e hiperpermeáveis, com um endotélio descontínuo assente numa membrana basal anormal e escassa quantidade de células musculares lisas [151, 152] de onde resultam forças osmóticas anormais e acumulação de grande quantidade de fluido intersticial [151].

A complexa vasculatura tumoral é um labirinto desorganizado onde as arteríolas, os capilares e as vénulas não são claramente identificados, com diâmetro e forma inconsistentes onde existem vasos descontínuos, shunts arteriovenosos e canais plasmáticos sem eritrócitos [151]. A resistência geométrica desta vasculatura impede a oxigenação e desencadeia microrregiões de hipoxia tumoral, resistentes à radioterapia e à quimioterapia [151], mas muito susceptíveis à hipertermia [155]. Também o fluxo sanguíneo é errático com microhemorragias e células endoteliais onde há níveis anormais de proliferação e apoptose [60, 153], muito diferentes da vasculatura normal [151]. Funcionalmente, a vasculatura tumoral é muito ineficiente tanto no fornecimento de oxigénio e nutrientes às células como na remoção de produtos do catabolismo pelos vasos linfáticos [151]. Os vasos linfáticos normais drenam fluido e detritos metabólicos do interstício [124, 151]. Os vasos linfáticos intratumorais são tipicamente colapsados e não funcionais [60] ou dilatados, frágeis e

descontínuos terminando em dilatações com fluido [151]. Pelo contrário, os vasos linfáticos peritumorais, para além de activos, são possíveis canais de metastização para os gânglios linfáticos [60, 124].

Há uma regulação fisiológica inerente à angiogénese tumoral que é mediada por inibidores angiogénicos de origem endógena derivados da clivagem proteolítica de proteínas estruturais durante a cicatrização e remodelação tecidual [60].

A etiologia da carcinogénese

Os compostos carcinogénicos genotóxicos, assim como os não-genotóxicos, podem alterar a epigenética e a genética relacionada com activação de oncogenes, inactivação de genes supressores tumorais, alterações genómicas associadas ao crescimento autónomo, aumento da sobrevivência, alteração de perfis de expressão génica necessários aos fenótipos malignos ou activação de vias de mutação endógena como o óxido nítrico ou radicais livres de oxigénio que contribuem para o desencadeamento da carcinogénese [49, 156].

Os carcinogénios que actuam directamente no DNA são chamados de genotóxicos de acção directa. Aqueles que requerem conversão enzimática, pela citocromo P450, muito abundante no retículo endoplasmático liso de hepatócitos são ditos de acção indirecta (Tabela 4) [49]. A citocromo P450 monoxigenase introduz um grupo polar reactivo no carcinogénio, tornando-o lipofílico, e em seguida converte-o num produto altamente electrofílico capaz de formar adutos, ou seja de formar ligações covalentes irreversíveis com o DNA que se traduzem em mutações permanentes e instabilidade genómica [49, 156-159]. Apesar da integridade dos mecanismos de reparação do DNA, as células em acentuada proliferação têm menos tempo para corrigir eventuais mutações, pelo que se encontram em maior risco de iniciação tumoral [49, 156-159]. Os grupos electrofílicos mais conhecidos são os grupos alquilo simples ou complexados, grupos aril-alquilo presentes por exemplo em compostos N-nitroso, epóxidos alifáticos, aflotoxinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAH) e combustão de produtos fósseis ou vegetais [156, 159]. Cada carcinogénio actua no DNA numa localização específica que depende da sequência de nucleótidos da célula hospedeira e de processos específicos de reparação do DNA como se de “impressão digital” se tratasse [49, 156]. Os PAH são carcinogénios de acção indirecta, transformados e activados pelo citocromo P450 em epóxidos, que formam adutos com o DNA, RNA e proteínas e a sua excreção envolve genes da via glutationa-S-transferase [156, 159]. Estão presentes no ar do ambiente e formam-se durante processos de sobreaquecimento de comida, incêndios, combustão de inflamáveis fósseis, fumo de tabaco, entre outros [47, 156, 159]. Os carcinogénios do fumo do tabaco mais relevantes são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e heterocíclicos como o DMBA, N-nitrosaminas, aminas aromáticas, 1,3-butadieno e benzeno e aldeídos, que actuam simultaneamente como iniciadores e promotores [157, 159-161].

Não obstante à carcinogénese química, também agentes biológicos e físicos podem estar implicados nestas doenças. Cerca de 15% dos tumores malignos são iniciados por vírus, bactérias e parasitas [124]. Estes agentes estão associados ao desencadeamento de inflamação crónica, o que suporta a interligação entre infecção, inflamação e cancro [124, 162, 163]. Já os factores físicos mais implicados são a radiação ionizante, radiação ultravioleta, radiofrequência e radiação por microndas, campos electromagnéticos e asbestos [164].

Em humanos, 80% da radiação ionizante vem da Natureza e 20% de fontes médicas como raios-x e raios gama [164]. Esta radiação induz a formação de iões, no DNA ou na água, geradores de ROS genotóxicos com quebra de cromossomas, translocações e mutações pontuais [164-166].

Tabela 4 – Principais químicos carcinogénicos. Adaptado de Stricker, 2013 [47].

Carcinogénios de acção directa	Carcinogénios de acção indirecta
Agentes alquilantes B-Propiolactona, Dimetil sulfato, Diepoxibutano, Fármacos anticancerígenos (ciclofosfamida, clorambucil, nitrosureas, etc.)	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e heterocíclicos Benz(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Dibenz(a,h)antraceno, 3-Metilcolantreno, 7, 12- Dimetilbenz(a)antraceno
Agentes acilantes 1-Acetil-imidazole, cloreto dimetilcarbamil	Aminas aromáticas e amidas 2-Naftilamina (β-naftilamina), Benzidina, 2- Acetilaminofluoreno, Dimetilaminoazobenzeno
	Plantas naturais e produtos microbianos Aflotoxina B1, Griseofulvina, Cicasina, Safrole
	Outros Nitrosaminas e amidas, Vinil clorado, Nickel, Crómio, Insecticidas, Fungicidas, Bifenois policlorados

Em humanos, reconhecem-se ainda outras etiologias favorecedoras das doenças oncológicas da mama, como o excesso de peso, a obesidade e o sedentarismo [167]. O excesso de tecido adiposo está associado a níveis elevados de insulina e de factores inflamatórios [167]. Em estudos relacionados com a dieta parece haver associação inversa entre a gordura alimentar monoinsaturada e o cancro de mama enquanto as frutas e as fibras parecem ser menos importantes na sua prevenção do que previamente se assumia [167]. Pelo contrário, a vitamina D é actualmente um dos agentes mais promissores na investigação das neoplasias da mama, estando provada a sua influência na promoção da diferenciação celular, inibição da proliferação celular e inibição da angiogénese [167]. Os raios UVB são a maior fonte de activação da síntese de vitamina D, apesar da via alimentar também contribuir para a dose diária recomendada [167].

As neoplasias são assim desencadeadas por uma combinação entre factores internos e externos, mas uma vez estabelecidas num órgão ou tecido, em geral, progridem dando origem a alterações mais ou menos evidentes. Por isso, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, o diagnóstico precoce é essencial para diferenciar entre lesões não-neoplásicas de neoplásicas e dentre estas, caracterizar o seu provável comportamento fisiopatológico de modo a estabelecer um plano terapêutico adequado e atempado [37, 168]. Neste âmbito, a utilização rotineira da citologia em patologia mamária, por metodologias bem padronizadas e com boa acuidade diagnóstica, é relativamente recente e tem tido uma evolução enorme nos últimos vinte anos [37, 168, 169]. A citologia aspirativa por agulha fina permite diferenciar entre processos inflamatórios, hiperplásicos e neoplásicos, o que contribui para a estadiação e avaliação de biomarcadores, para além de apresentar vantagens sobre a biópsia, já que é minimamente invasiva, de baixo risco, rápida, económica e apresenta boa acuidade diagnóstica [37, 168-170]. Outras técnicas são fundamentais para completar a abordagem diagnóstica e terapêutica como a biópsia avaliada por histopatologia, imunohistoquímica (IHC) e por técnicas de patologia molecular [171], e exames imagiológicos como a radiologia simples e tomográfica, a ecografia, a ressonância magnética nuclear e a medicina nuclear [16, 37, 169, 170, 172].

Diagnóstico histopatológico das neoplasias da mama e terapêuticas convencionais

A glândula mamária caracteriza a classe dos mamíferos pela sua capacidade de produção e secreção de leite, como forma de alimentar a descendência e de lhe facultar imunidade passiva, para além de estreitar os laços familiares [173]. No entanto há uma grande variedade quanto à histomorfogénese, desenvolvimento, genómica e metabolismo da glândula mamária [174]. Na Tabela 5 dá-se uma perspectiva comparativa quanto às principais características anatómicas e ocorrência de tumores espontâneos entre humanos e as espécies de interesse veterinário e de interesse experimental [174, 175].

Tabela 5 – A glândula mamária em mamíferos de interesse veterinário e de interesse experimental numa perspectiva comparativa com a espécie humana. A anatomia e os tumores espontâneos. Adaptado de Rowson, 2012, Veltmaat, 2013, Proper, 2013, Baba, 2007 e Sorenmo, 2011 [5, 29, 36, 173-177].

Espécies	Nº de gl. mamárias	Posição	Nº de galactóforos	Proliferação epitelial	Tumores mamários	Precursor tumoral	Tumores hormono-dependentes
Humanos	2	Peitoral	8-15	Concentrado nos TEB e TDLU	Espontâneos	ADH, DCIS	50-60%
Murganho	10	Tórax Abdómen Inguinal	1	Concentrado nos TEB e alvéolos	Espontâneos e virais	AH, ADH, DCIS	Rara nos tumores espontâneos
Rato	12	Tórax Abdómen Inguinal	1	Concentrado nos TEB e alvéolos	Espontâneos	AH, ADH, DCIS	Rara nos tumores espontâneos
Coelho	10	Tórax Abdómen Inguinal	8		Espontâneos		
Felídeos	8	Tórax Abdómen Inguinal	2		Espontâneos		Inconsistente
Canídeos	10	Tórax Abdómen Inguinal	8-22		Espontâneos		Inconsistente
Caprinos e ovinos	2	Inguinal	1	Zonas periféricas e TDLU	Raros	Desconhecido	Desconhecido
Bovino	4	Inguinal	1	Zonas periféricas e TDLU	Raros	Desconhecido	Desconhecido
Suínos	8-18	Tórax Abdómen Inguinal	2	Concentrado nos TEB e TDLU	Raros	Desconhecido	Desconhecido
Equino	4	Inguinal	2		Espontâneos	Desconhecido	Desconhecido
Primates não-humanos	2	Peitoral	5-7		Espontâneos	DCIS	Desconhecido

ADH, Atypic ductal hyperplasia; AH, Alveolar hyperplasia; DCIS, Ductal carcinoma in situ; TDLU, Terminal ductal lobular unit; TEB, Terminal end-bud.

Em humanos, a mama normal é uma glândula tubuloalveolar composta com lóbulos produtores de leite e ductos interlobulares que transportam o leite até ao mamilo [55]. A sua estrutura epitelial é composta por um epitélio em bicamada, sendo que a camada interna, ou luminal, é formada por células alveolares produtoras de leite e por células ductais enquanto a camada externa é formada por células mioepiteliais, contíguas à membrana basal de suporte [36, 55, 178-181].

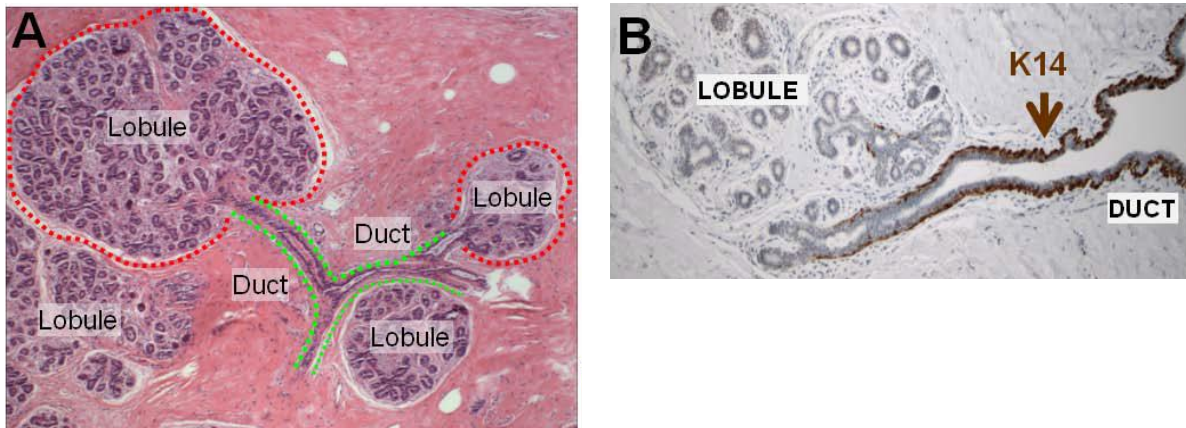


Figura 29 – (A) Histologia de glândula mamária humana onde se destacam os lóbulos e os ductos intercalares. HE, 40x. (B) Imunohistoquímica para K14 no epitélio normal de mama humana. Neste segmento observa-se que as células mioepiteliais dos ductos interlobulares são positivas (castanho) e a maioria das células mioepiteliais dos lóbulos são negativas para este marcador (100x). Adaptado de santagata, 2014 [55].

Na classificação mais habitual, considera-se que as células epiteliais da mama podem ser categorizadas em estaminais, progenitoras e diferenciadas [178, 179]. Experimentalmente as células estaminais têm a capacidade de regenerar a glândula mamária e a sua actividade concentra-se sobretudo na camada basal [178, 180]. As células progenitoras são luminais, não expressam receptores de estrogénio (*estrogen receptor*, ER) e dão origem às células luminais de diferenciação terminal, ER positivas (Figura 31), o que sugere uma hierarquia celular e molecular na glândula mamária [180-183]. Muito recentemente Santagata et al. apresentou um estudo do fenótipo molecular das células normais da mama e verificou que existiam 11 estados de diferenciação das células luminais e dois estados de diferenciação das células mioepiteliais (Figura 30) [55]. Estes investigadores usaram IHC para marcar os receptores hormonais do estrogénio, androgénio e vitamina D, as queratinas 5, 14 e 17, Ki67, claudina 4, queratinas 7, 8 e 18, e CD10, α -actina de músculo liso (*smooth muscle actin*, SMA) e p63 [55]. Estes investigadores verificaram que apenas as células luminais expressam queratina 7, queratina 18 e claudina, enquanto apenas as células mioepiteliais expressam CD10, SMA e p63 [27, 55, 179].

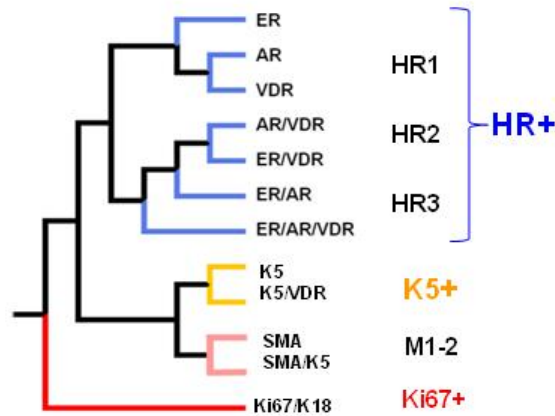


Figura 30 – Possível árvore filogenética de diferenciação dos subtipos epiteliais da mama normal. As células positivas para receptores hormonais (HR+) têm uma célula progenitora comum, diferente da célula progenitora das células que são positivas para K5 e das células mioepiteliais (M1-2). A célula progenitora comum dos três grupos, HR+, K5+ e M1-2, parece ser uma célula Ki67/K18+ e HR/K5/SMA- consistente com um fenótipo proliferativo. Adaptado de Santagata, 2014 [55].

Quanto aos receptores dos factores de crescimento epidérmico, a glândula mamária humana normal não expressa HER2 [184], mas antes uma população celular caracterizada por baixa expressão de ERBB3, um dos quatro membros da família de receptores do factor de crescimento epidérmico envolvido na regulação do metabolismo, tamanho celular, proliferação, sobrevivência e angiogénese [180, 185]. Estas células têm um fenótipo relativamente indiferenciado, intermédio entre células luminais e células basais, mas com potencial de crescimento reduzido. A sua função não é conhecida com rigor, mas a partir de estudos feitos em murganho, pensa-se que esteja envolvida na alveologénese [186]. O ERBB3 é sobreexpresso em 22% dos cancros de mama e 25% dos casos são ERBB3 negativo [180].

A ALDH também tem diferentes padrões de actividade consoante a diferenciação das populações celulares da glândula mamária. A sua actividade é baixa nas células epiteliais primitivas e elevada nas células luminais diferenciadas [187]. A presença desta diversidade de células na glândula mamária alicerça a hipótese de que a heterogeneidade tumoral é um produto da transformação maligna nestes diferentes tipos celulares [55, 178, 180, 181].

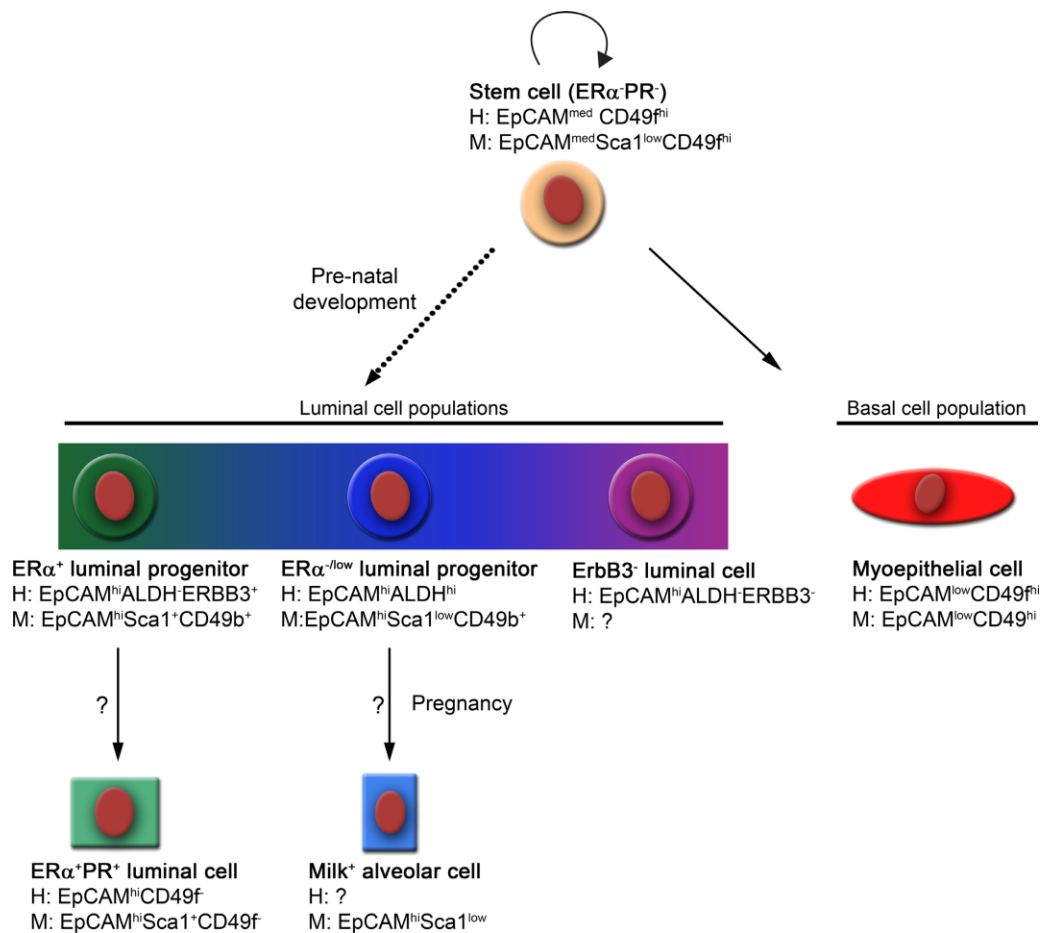


Figura 31 – Proposta de hierarquia celular na glândula mamária de murgancho (M) e de humanos (H). As células estaminais auto-renovam-se ou diferenciam-se, durante a embriogênese, em células luminiais progenitoras ou em células mioepiteliais. Estímulos ambientais permitem que a população progenitora se diferencie em célula ductal, ER positivo e PR positivo, ou em célula alveolar secretora de leite durante a gestação. ALDH, aldeído desidrogenase; EpCAM, *epithelial cell adhesion molecule*; ER, *estrogen receptor* PR, *progesterone receptor*. Adaptado de Shehata, 2012 [180].

A glândula mamária do murgancho e do rato têm muitas semelhanças, desde a embriogênese até à anatomia e fisiologia, com exceção para o dimorfismo sexual nos machos de murgancho que não apresentam mamilos [138, 188]. As fêmeas desta espécie têm cinco pares de glândulas mamárias enquanto as fêmeas de rato têm seis pares, ao longo de duas linhas ventrolaterais distribuídas pela região cervical, torácica, abdominal e inguinal, [1, 138, 188, 189]. Convenientemente numeram-se de 1-10 ou de 1-12 no murgancho e no rato, respectivamente, no sentido craneal-caudal e da esquerda para a direita [175]. Cada glândula mamária estende-se lateralmente no tecido subcutâneo adjacente e tem um mamilo exterior ligado ao epitélio ductal primário, ducto galactóforo, que permite a secreção de leite durante a lactação [138, 188, 189]. É formada por epitélio, tecido adiposo e tecido conjuntivo interceptado por vasos sanguíneos e linfáticos, fibras musculares lisas, nervos, gânglios linfáticos e, junto do mamilo, por epitélio queratinizado e glândulas sudoríparas e sebáceas [190]. Cada almofada lipídica é delimitada por uma cápsula de tecido conjuntivo fibrillar muito vascularizado que demarca a área de crescimento de cada glândula [190] e septos de tecido conjuntivo que a dividem em lobos possivelmente inibitórios da invasão ductal [190]. O epitélio mamário consiste em ductos ramificados contínuos desde o mamilo até ductos mais pequenos ou dúctulos, que terminam em rebentos terminais (*terminal end buds*, TEB) [138, 189, 190]. Os TEB são estruturas sólidas ou semi-sólidas em forma de

bolbo, localizadas na extremidade dos ductos em crescimento, e têm o maior índice proliferativo da glândula mamária, o que permite o alongamento e ramificação glandular pela almofada lipídica, mas também o torna um alvo primordial de genotoxicidade por carcinogénios químicos [138, 189, 190]. Os TEBs consistem num epitélio estratificado onde a camada externa é formada por células estaminais pluripotenciais, que assentam numa lâmina basal carente de estroma, o que facilita a infiltração nos tecidos envolventes (Figura 32) [189, 190]. Estas células de cobertura e intensa actividade mitótica [191] originam as células mioepiteliais dos ductos mamários e as células luminais, o que resulta localmente numa área com múltiplas camadas celulares [189, 190]. A proliferação celular diminui significativamente nas células quando se diferenciam em células mioepiteliais e ductais [191], então os fibroblastos formam um estroma em redor da membrana basal que fica justaposta a uma monocamada epitelial alveolar [189]. O túbulo terminal forma-se por apoptose das células centrais que origina o lúmen [190].

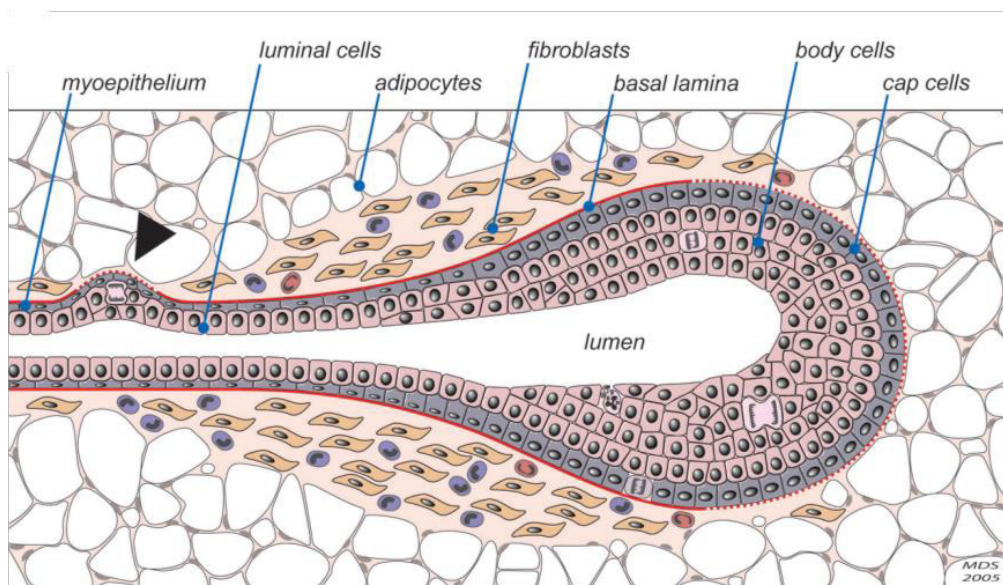


Figura 32 – Representação esquemática de um rebento terminal (*terminal end bud*, TEB) e ducto primário. Notar o epitélio estratificado do TEB formado por uma camada externa de células estaminais em elevado índice mitótico que forma as restantes camadas também em proliferação. A membrana basal é muito escassa na extremidade infiltrativa do tecido adiposo. O colar de estroma é rico em fibroblastos com presença de eosinófilos (representados a vermelho) e macrófagos (representados a azul). Formação de uma nova ramificação a partir do ducto primário (seta fechada). Adaptado de Sternlicht, 2006 [192].

Anterior ao nascimento dá-se a invasão da almofada lipídica por uma estrutura ductal rudimentar [189, 190, 192] que se desenvolve na dependência de numerosas hormonas incluindo estrogénios, androgénios, progesterona, prolactina, hormona de crescimento, insulina, catecolaminas e hormona adrenocorticotrópica [1, 138]. No rato e murganho, aos 21 dias o número de TEB é máximo, após o que, a influência hormonal dos ciclos éstricos da puberdade, com início pelos 30-42 dias, estimula a divisão dos TEB e a sua diferenciação em rebentos alveolares [138, 190]. Aos 55 dias, a mama está parcialmente diferenciada (Figura 33) continuando em desenvolvimento até à idade adulta no rato e murganho (10-12 semanas) [138, 189, 192]. A diferenciação completa-se durante a gestação para produção de leite no pós-parto, envolvendo em seguida [138, 189, 190].

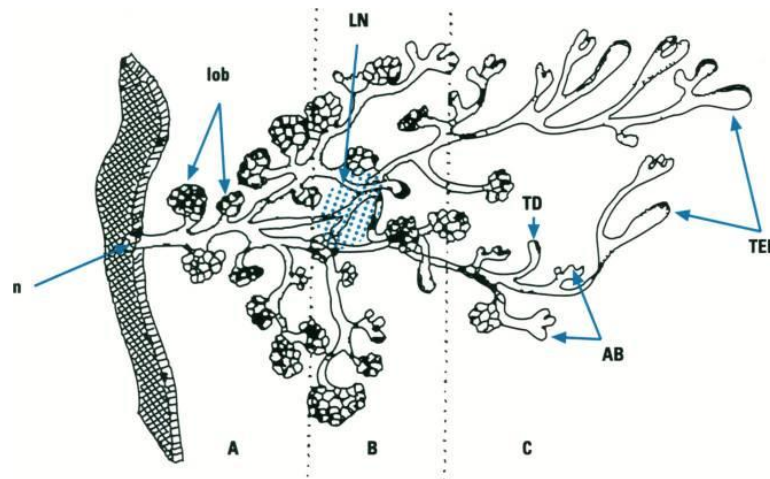


Figura 33 – Representação esquemática da quarta glândula mamária abdominal numa fêmea virgem de rato com 55 dias de idade. A glândula divide-se em três zonas. A zona A, proximal ao mamilo (n), contém numerosos lóbulos primários (lob). A zona B, medial, engloba o gânglio linfático. A zona C, distal ao mamilo, contém a maioria dos TEBs em crescimento activo, rebentos alveolares e ductos terminais. AB, *alveolar buds*; TD, *terminal ducts*, TEB, *terminal end bud*. Adaptado de Russo, 1996 [138].

A diferenciação mamária é heterogénea e sequencial [138, 189, 190] porque ao longo das linhas mamárias há um gradiente decrescente de TEBs desde as glândulas mamárias cervicais até às inguinais sendo o primeiro par o menos diferenciado e o último, o mais diferenciado [175, 193]. Por isso, nos tumores induzidos quimicamente entre os 45-60 dias de vida, verificam-se mais tumores malignos nas glândulas mamárias cervicais e torácicas ao passo que nas abdominais e inguinais surgem tumores tendencialmente benignos ou alterações não-neoplásicas [138, 193, 194].

A caracterização da proliferação celular é importante para caracterizar o desenvolvimento da glândula mamária com os agentes etiológicos que lhe induzem alterações. A marcação da proliferação por imunohistoquímica com anticorpos específicos para Ki67, bromodeoxiuridina (BrDU) e antigénio nuclear de proliferação celular (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) não tem variação significativa entre si, apesar do BrDU marcar apenas as células em fase S do ciclo celular [191], o PCNA ser sintetizado pouco antes da fase-S e do Ki67 marcar todas as fases, com excepção de G0 [191, 195, 196]. Também o método de corte da glândula mamária normal não influencia a marcação da proliferação [191]. Quanto à localização, em ratos fêmea jovens, a proliferação é ligeiramente mais marcada nas glândulas mamárias craneais, ao passo que em fêmeas maduras essa diferença não se verifica [191]. Já o ciclo éstrico altera de forma muito evidente a proliferação celular, sendo o metaestro a fase de maior proliferação [191]. Quanto às restantes fases reconhecem-se alterações histológicas da glândula mamária ao longo do ciclo éstrico [188], relevantes em estudos toxicológicos [191].

A classificação patológica dos tumores de mama em humanos evoluiu muito durante as duas últimas décadas [27, 55, 171]. A identificação do tipo histológico e grau tumoral bem como a caracterização molecular do cancro de mama são hoje elementos fundamentais na patologia moderna [27, 55, 171]. A organização

mundial de saúde actualizou recentemente a classificação do cancro de mama em humanos (Tabela 6) sem desprezar parâmetros adicionais no estabelecimento do prognóstico como o tamanho da lesão, a presença de invasão nos vasos linfáticos ou sanguíneos, o estado dos gânglios linfáticos e o grau histopatológico [171]. O sistema de graduação elaborado por *Elston and Ellis* é muito utilizado em clínica oncológica e representa um factor-chave na tomada de decisões clínicas [171]. Este sistema, também denominado de sistema de *Nottingham*, baseia-se na avaliação da diferenciação, expressa pela quantidade de formações tubulares, no pleomorfismo nuclear baseado na comparação dos núcleos neoplásicos com os núcleos de mama normal e na actividade mitótica, calculada pelo número de mitoses em dez campos de grande aumento devidamente padronizados ao microscópio em utilização [171]. A avaliação histopatológica por HE continua a ser a pedra basilar do diagnóstico das neoplasias da mama. No entanto a caracterização molecular é crescente na patologia contemporânea [171, 197].

Tabela 6 – Classificação histopatológica do cancro de mama pela Organização Mundial de Saúde. Adaptado de Tos, 2013 [171].

Carcinoma invasivo indiferenciado
Tipos especiais de carcinoma
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma cribriforme
Carcinoma com características medulares
Carcinoma metaplásico
Carcinoma com diferenciação apócrina
Tumor tipo anexos cutâneos/glândula salivar
Carcinoma quístico adenoide
Carcinoma polimórfico
Carcinoma mucinoso (inclui a variante em anel de sinete)
Carcinoma com características neuroendócrinas
Carcinoma papilar invasivo
Carcinoma micropapilar invasivo
Carcinoma inflamatório
Tipos e variantes e raras excepcionais

Nas fêmeas de rato e murganho e em canídeos e felídeos domésticos são frequentes os tumores de mama espontâneos [4, 29, 37, 138, 198], enquanto nas restantes espécies de interesse veterinário são esporádicos [4, 29]. A organização mundial de saúde recomenda que a classificação histopatológica dos tumores de mama de canídeos e felídeos seja, sempre que possível, à semelhança da classificação dos tumores de mama em humanos [5, 29]. Do mesmo modo, a graduação dos tumores invasivos segue os critérios da patologia humana, onde a soma da semiquantificação, em valores de 1-3 relativa à diferenciação celular, anaplasia e número de mitoses em dez campos de grande aumento (o número de mitoses em cada nível de 1-3 varia com a área do campo visual dependente do microscópio utilizado), permitem calcular o grau do tumor. Quando a soma se situa entre 3-5 pontos, os tumores são de grau I, entre 6-7 pontos de grau II e entre 8-9 pontos de grau III [29, 199-201]. A graduação tem valor de prognóstico, apesar de outras características também serem consideradas como o tamanho do tumor, o envolvimento dos gânglios linfáticos, a invasão vascular, a intensidade de infiltração e a caracterização molecular de marcadores imunofenotípicos como a expressão de marcadores da proliferação, de receptores hormonais, da adesão celular e das vias de sinalização [4, 29, 74, 202].

Os tipos morfológicos de cancro de mama em canídeos e felídeos incluem o tubulopapilar, sólido, cribriforme, comedo e carcinoma anaplásico [4]. Salvo algumas inconsistências metodológicas que urge padronizar [6, 74], os tumores de mama, em especial da cadela mas também da gata, são semelhantes aos humanos no que respeita a algumas alterações quanto à caracterização molecular, por exemplo diminuição da E-caderina, aumento da P-caderina, diminuição do p53 [5, 176, 198, 203-207] e diminuição da expressão de claudina [208]. A variação de marcação dos receptores de estrogénio e progesterona é inconsistente, ainda assim, estes animais são úteis para desenvolver bons modelos de estudo na investigação translacional [5, 176].

Tabela 7 – Classificação histopatológica dos tumores de mama de cão, gato e rato/murganho. Adaptado de Misdorp, 1999, Costa, 2002, Rudman, 2012, Baba, 2007, Man, 1996 [1, 29, 209-211].

	Animais de companhia		Animais de experimentação
	Cão	Gato	Rato e murganho
Carcinomas	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma complexo Carcinoma simples: tubulopapilar, sólido, anaplásico Carcinomas de tipos especiais: de células fusiformes, espinocelular, mucinoso, rico em lípidos	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma tubulopapilar Carcinoma sólido Carcinoma cribriforme Carcinoma espinocelular Carcinoma mucinoso	Carcinoma <i>in situ</i> Adenocarcinoma com variação dos subtipos: alveolar/tubular, comedo, cribriforme, quístico, medular/sólido, papilar, cirroso, células fusiformes, indiferenciado Adenocarcinoma em fibroadenoma Carcinoma adenoescamoso Carcinoma espinocelular
Sarcomas	Fibrossarcoma, osteossarcoma, outros sarcomas		Sarcoma em fibroadenoma
Carcinosarcoma	Carcinosarcoma	Carcinosarcoma	Carcinosarcoma
Carcinoma ou sarcoma em tumores benignos	Carcinoma ou sarcoma em tumores benignos	Carcinoma ou sarcoma em tumores benignos	
Tumores benignos	Adenoma: simples, complexo, basaloide Fibroadenoma: de baixa celularidade ou alta celularidade Tumor misto benigno Papiloma ductal	Adenoma: simples, complexo Fibroadenoma: de baixa celularidade ou alta celularidade Tumor misto benigno Papiloma ductal	Adenoma: papilar, tubular e de lactação Fibroadenoma Adenomioepitelioma Tumor misto benigno
Hiperplasias/Displasias mamárias	Hiperplasia ductal Hiperplasia lobular: hiperplasia epitelial, adenose Quistos Ectasia ductal Fibrose focal (fibroesclerose) Ginecomastia	Hiperplasia ductal Hiperplasia lobular: hiperplasia epitelial, adenose Alteração fibroadenomatososa Quistos Ectasia ductal Fibrose focal (fibroesclerose)	

As neoplasias da mama são muito variáveis e consideram-se como sendo um conjunto de diferentes doenças com “assinaturas moleculares” distintas e diferentes prognósticos que orientam diversas opções terapêuticas [66, 171, 178, 212]. Na actualidade, o mapeamento genómico é extenso e muito detalhado com vista ao estabelecimento de subtipos tumorais e suas variantes, importante na avaliação clínica, terapêutica e prognóstica [66, 213].

As diferentes formas de cancro de mama caracterizam-se pela sensibilidade hormonal e pela existência de receptores de crescimento [214], avaliados por imunohistoquímica e expressão génica [43, 66, 171, 178, 212]. A marcação do ER, do receptor de progesterona (*progesterone receptor*, PR), do HER2, dos receptores tirosina cinase, o estado da proteína Ki67 e ainda os perfis de expressão génica identificam, em

conjunto, quatro subtipos tumorais padronizados e um tipo tumoral semelhante a mama normal [27, 66, 171, 178, 212, 214, 215]. Estes são os chamados subtipos intrínsecos e definem a actual classificação molecular dos tumores de mama (Tabela 8) com diferenças entre si no que respeita à incidência, sobrevida e responsividade terapêutica [66, 171, 212, 215].

Tabela 8 - Classificação molecular dos tumores de mama em humanos. Adaptado de Santagata, 2014, Tos, 2013 e Goldhirsch, 2011 [55, 171, 216].

Subtipo	Definição clinicopatológica	
Luminal A	ER-positivo e/ou PR-positivo HER2-negativo Ki67 baixo (<14%)	
Luminal B	Luminal B (HER-negativo) ER-positivo e/ou PR-positivo HER2-negativo Ki67 alto	Luminal B (HER-positivo) ER-positivo e/ou PR-positivo HER2-positivo Qualquer valor de Ki67
HER-2 positivo (não-luminal)	HER2-positivo ER-negativo e PR-negativo	
Tipo basal	Triplo-negativo (sem especificação de tipo) ER-negativo e PR-negativo HER2-negativo	
ER, Estrogen receptor; HER, Human epidermal growth factor receptor; PR, Progesterone receptor.		

Sumariamente, os tumores ER positivos são denominados luminal A e luminal B e, em geral, são de baixo grau de malignidade [178, 212], o subtipo tumoral rico em HER2, com grande expressão deste receptor é negativo para ER e PR [178, 212] e o tumor tipo-basal, também chamado de triplo-negativo, não expressa qualquer um destes três receptores [27, 178, 212].

O subtipo luminal A é o mais frequente e representa cerca de 40% dos carcinomas de mama [27, 66, 178, 212]. A IHC dos tumores luminal A caracteriza-se pela expressão de ER, PR, Bcl-2 e CK8/18 e ausência de expressão de HER2 com baixos níveis de proliferação, aferida pelo Ki67, e grau histológico baixo. O marcador GATA3 tem uma expressão muito aumentada no subgrupo luminal A [27, 66, 178, 212]. Estes tumores são de crescimento lento, menos agressivos do que os outros subtipos e estão associados a um prognóstico mais favorável a curto prazo, já que a expressão do ER é preditiva de uma resposta terapêutica eficaz [27, 66, 178, 212]. No entanto foram identificadas várias mutações genéticas adicionais que, convenientemente agrupadas, caracterizam variações deste subtipo com implicação terapêutica e de prognóstico [212, 214]. Contudo, a sobrevida a longo prazo é semelhante aos outros subtipos de cancro de mama ou até menor [66, 171, 212].

O subtipo luminal B representa cerca de 10% a 20% e, tal como o luminal A, expressa o ER e/ou o PR e ainda o HER2 [66, 212, 214]. As mulheres com mutação no gene *BRCA2* têm risco aumentado de vir a contrair um sub-tipo luminal [27, 213]. Comparativamente aos tumores luminais do tipo A, os do tipo B têm genomas mais complexos, potencial replicativo maior, índices de proliferação celular, Ki67, mais elevados [216] com tendencialmente mais mutações no oncogene TP53 e com vias alternativas de crescimento como o receptor do factor de crescimento 1, o polipeptídeo alfa-catalítico fosfatidilinositol 3-cinase (*phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*, PIK3CA) e o receptor de esteróides co-activador (*steroid receptor co-activator*, Src)

[27, 212, 213]. O prognóstico associado aos tumores luminal B é pior do que o aferido para os luminal A com maior taxa de recidiva e morte [27, 66, 212, 213].

O subtipo HER2 não-luminal, ER e PR negativo, perfaz cerca de 10% dos tumores de mama e expressa em excesso a proteína promotora do crescimento HER2 por um processo de amplificação que, simultaneamente afecta a expressão dos genes que lhe estão próximos no genoma, o que tem implicações clínicas [27, 66, 212]. Estes tumores são maioritariamente de grau elevado em histopatologia, tendem a crescer de forma mais agressiva e estão associados, a curto prazo, a um prognóstico pior do que os tumores ER positivo [27, 66, 212]. No entanto, as novas terapêuticas com alvos moleculares têm revertido o impacto da sobreexpressão de HER2 [27, 212].

O subtipo basal representa cerca de 10% a 20% dos cancros de mama, é particularmente agressivo, indiferenciado e recidivante [27, 212, 217]. Com IHC não há evidência de marcação de ER, PR ou HER2 e por isso é também denominado de triplo-negativo [27, 43, 212, 217]. Apresentam mutações nos genes PIK3CA, TP53, AKT1, GATA3 e MAP3K1, mas também foi encontrada a fusão MAGI3-AKT3 [27, 43, 212, 217]. A grande actividade da via PI3K, associada à proliferação celular, é considerada a assinatura dos tumores triplo-negativo [27, 213]. Há ainda a expressão de um grupo único de genes, conhecido como *cluster* basal, que inclui a citoqueratina 5 (CK5), CK14 e CK17, o receptor do factor de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), c-Kit, vimentina, P-caderina, fascina, caveolinas 1 e 2 e $\alpha\beta$ -cristalina [27, 212, 217]. Recentemente foi demonstrado que o biomarcador nestina é expresso nos tumores triplo-negativo com grande especificidade [27, 212, 217]. Os factores de risco para este subtipo tumoral são a mutação no gene *BRCA1*, a pré-menopausa entre outros [27, 212]. O *BRCA1* é um gene supressor tumoral com actividade nas células basais em replicação, pois participa na reparação do DNA, e a sua disfunção permite a transmissão de genótipos e fenótipos alterados [27, 178, 212]. A forma esporádica do subtipo basal inclui amplificação do *c-Myc*, mutação no *p53* e expressão de EGFR [27, 43]. A instabilidade genómica, sugestiva de perda da regular reparação do DNA, aparece como a imagem identitária da forma esporádica do subtipo basal e da forma associada ao *BRCA1* [27]. O prognóstico associado a estes tumores é mais reservado do que nos restantes subtipos, já que carece de alvos moleculares terapêuticos [27, 212].

O quinto subtipo forma o grupo tumoral semelhante a mama normal ou fibroadenoma, é menos definido do que os anteriores e representa cerca de 5-10% de todos os tumores de mama [66, 212]. É um grupo heterogéneo que inclui tumores ricos em tecido conjuntivo, tumores com intenso infiltrado linfocitário e tumores infiltrados por células epiteliais normais e com escasso conteúdo celular maligno [212]. Expressam genes característicos de tecido adiposo, têm prognóstico intermédio entre o subtipo luminal e o subtipo basal e, em geral, não responde à quimioterapia neo-adjuvante [66]. Não expressam ER, PR ou HER, por isso também podem ser classificados como triplo-negativo, não sendo contudo classificados como tipo-basal já que são negativos para CK5 e EGFR [66]. O significado clínico destes tumores é indeterminado e a sua raridade dificulta um estudo detalhado, havendo quem defenda que se trata de um artefacto técnico [66].

Recentemente, em 2007, outro subtipo tumoral, comum aos humanos e aos murganhos, foi reportado [212, 215, 218] – o subtipo-baixo em claudina. Este é um tipo tumoral raro, 12-14% [66], igualmente triplo-negativo e que se caracteriza por escassa expressão de genes envolvidos nas junções firmes de aderência intercelular relacionados com a expressão de claudina 3, 4 e 7, ocludina e E-caderina, bem como uma elevada expressão de

genes envolvidos na EMT como a vimentina, Snai1, Snai2 e Twist1 [27, 66, 212, 215, 218]. Este sub-tipo tumoral é rico em células estaminais precursoras de tumores que expressam ALDH1 e são CD44+/CD24-, o que reflecte o espectro da indiferenciação das células progenitoras [27, 212, 215, 218], ou seja adquirem o fenótipo de CSC, apesar da baixa expressão de genes relacionados com a proliferação celular [66]. Os tumores pobres em claudina representam o aprisionamento no estado estaminal mais primitivo, seguido dos tumores tipo-basal aprisionados no estado progenitor luminal e por último pelos tumores A/B onde a diferenciação celular é evidente [27, 212, 215, 218]. Os tumores baixos em claudina têm um prognóstico muito reservado, e baixa resposta à terapia neoadjuvante [66]. Por último, as células tumorais do estroma têm capacidade de contribuir para o desenvolvimento e progressão do tumor [124, 131, 219]. Também as células imunitárias têm tido uma relevância crescente na progressão e na metastização [220]. O perfil das células do estroma bem como o das células inflamatórias são alvos terapêuticos em intensa investigação e podem prever a evolução clínica em doentes com cancro de mama [124, 131, 212, 219].

O desenvolvimento de biomarcadores revolucionou o diagnóstico precoce das doenças oncológicas bem como a sua monitorização clínica. Em medicina humana e medicina veterinária, um biomarcador é definido como um indicador que avalia e mede objectivamente processos biológicos normais, processos patológicos ou a resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica [58, 74]. Os recentes avanços em biologia celular e molecular permitiram explorar “assinaturas genéticas” como marcadores da doença [58]. Em particular, os perfis genómicos, proteómicos, metabolómicos e de tecidos, e a detecção de ácido nucleico no soro providenciam marcadores teóricos para uso clínico [58]. Os marcadores tumorais podem ter origem em DNA, RNA, proteínas, células ou tecidos. Os processos tecidulares anormais, quando detectados, como a neovascularização, também podem ser marcadores [221]. A detecção da amplificação de um gene, por exemplo o *HER2*, marcador de cancro de mama, pode ser avaliada por hibridização *in situ* cromogénica ou fluorescente, hibridização genómica comparativa de alta resolução ou por tecnologia *dot blot* [221]. Já a sua expressão pode ser avaliada por reacção em cadeia da transcriptase reversa (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) ou por análise de microarranjo e a proteína sobreexpressa HER2 pode ser quantificada por *Western blot*, imunohistoquímica, imunofluorescência ou ELISA [221].

No contexto oncológico, os biomarcadores orientam actualmente a terapêutica molecular personalizada [58] e são usados para (1) diagnosticar a doença num estadio inicial, num estadio de remissão ou recidiva, (2) como um indicador de prognóstico e (3) como indicadores preditivos acerca da eficácia terapêutica [58, 74]. Podem ter origem em tecidos, soro, urina ou imagem por radioisótopos. O biomarcador tumoral ideal deve ser único na identificação do tecido maligno e deve gerar um sinal positivo com uma boa relação sinal/ruído, isto é, pode ser medido sem geração simultânea de ruído, proveniente de tecidos normais ou de outras patologias não-malignas [222]. Deve ainda limitar os testes falso-positivos e identificar os tumores mais letais [222]. Muitas moléculas candidatas à biomarcação são proteínas da superfície celular e de secreção e pertencem a vias intrínsecas de células normais e tecidos como as que medeiam a proliferação, apoptose, diferenciação, angiogénese, morte celular e inflamação [222]. As alterações somáticas adquiridas no DNA de neoplasias malignas tem grande potencial de detecção porque são restritas ao tumor e detectáveis pelas

tecnologias disponíveis [222]. A identificação de uma alteração estrutural ou mutação identifica uma fracção dos cancros prevalentes, o que leva à necessidade de estudar múltiplas vias completas ou de *loci* de cromossomas [222]. Essas análises têm utilidade se detectarem células malignas destinadas a crescer, metastizar ou a causar morte. Mas um tumor é uma estrutura complexa, genética e fenotipicamente heterogénea no tempo e no espaço, por isso o foco nas mutações ou nas alterações estruturais têm, *per si*, um valor limitado na predição do comportamento biológico e clínico [222]. Muitos biomarcadores falham porque a maioria das neoplasias beneficia de instabilidade genómica e requerem múltiplas alterações genéticas para se tornarem metastáticas [222].

Os receptores de estrogénio e de progesterona são marcadores preditivos [221, 223]. O ER, em combinação com outros factores, é também um elemento de prognóstico no cancro de mama [223]. Estes receptores são avaliados por IHC e registados em percentagem e intensidade de marcação celular, sendo esta técnica considerada sensível, específica e económica [171, 224]. A determinação de positividade *versus* negatividade destes receptores é crítica na selecção dos doentes para terapia endócrina e na predição da responsividade à terapêutica hormonal [18, 171, 224]. Em humanos cerca de 80% dos tumores de mama invasivos expressam o ER com intensidade variável e até os tumores com expressão de 1% são considerados positivos [171]. A anatomopatologia passou, assim, a ser central na integração entre diagnóstico, prognóstico, planeamento terapêutico e parâmetros preditivos [171, 224]. A expressão de PR, avaliada na rotina da anatomopatologia por IHC e é detectada em aproximadamente 60-70% dos carcinomas invasivos [171, 224] e atesta a funcionalidade da via endócrina mediada pelo ER, já que este receptor regula a expressão do primeiro [171, 224]. A intensidade da sua marcação está directamente correlacionada com a eficácia à terapia hormonal [171, 224].

O biomarcador de prognóstico e de predição [223], HER2, também conhecido como ERBB2, representa um proto-oncogene localizado no cromossoma 17 e encontra-se amplificado em 15% dos carcinomas invasivos da mama [171]. A sua amplificação está fortemente correlacionada com o aumento da expressão proteica, detectada por IHC [171], e com mau prognóstico, não obstante, à resposta farmacológica eficaz com recurso a moléculas específicas dirigidas ao HER2 (i.e. trastuzumab e lapatinib) [171, 223].

A proliferação descontrolada é uma das características mais marcantes das neoplasias malignas [225, 226]. O Ki67 é uma proteína nuclear, não-histona que está presente nas células em proliferação em todas as fases activas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas não em células quiescentes [225, 227], tendo por isso um grande interesse como biomarcador da proliferação celular tumoral [225, 226]. A sua detecção por IHC através do anticorpo *mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1* (MIB1) é registada em percentagem de células positivas como uma boa correlação [225, 226]. Em geral os marcadores de uma taxa de proliferação elevada estão correlacionados com prognósticos menos favoráveis em doentes não-tratados e podem adicionar informação no que respeita aos benefícios da quimioterapia [226]. O valor prognóstico do Ki67 em doentes com cancro de mama inicial não é consensual havendo estudos de análise multivariada com resultados díspares relativamente a este marcador [226]. A sua importância é mais relevante quando se consideram sub-grupos tumorais definidos e/ou como parte de painéis multiparamétricos de biomarcadores como por exemplo no IHC4 que avalia o ER, PR, HER2 e Ki67 [226, 228]. A avaliação da proliferação tumoral por Ki67 é aconselhada se a

metodologia estiver de acordo com as normas de standardização, conforme as recomendações do *International Ki67 assessment in breast cancer* [216, 226, 229].

A urocinase activadora do plasminogénio (*urokinase plasminogen activator*, uPA) e o inibidor da activação do plasminogénio activador (*plasminogen activator inhibitor*, PAI-I) são biomarcadores preditivos, actualmente em avaliação [223]. Estão relacionados com a invasão tumoral e são analisados por ELISA [226]. A uPA é uma serina protease muito importante na invasão e metastização tumoral [226]. A ligação com o seu receptor (*urokinase plasminogen activator receptor*, uPAR) converte o plasminogénio em plasmina e medeia a degradação da matriz extracelular durante a invasão tumoral [226]. O inibidor PAI-1 está elevado nos tecidos e no plasma, mas fica inactivo quando se liga ao uPA [226]. Os níveis de uPA, uPAR e PAI-1 são usados para inferir do risco de recorrência de cancro de mama na ausência de metástases ganglionares, sendo que níveis elevados destes biomarcadores estão associados a menor sobrevida [226].

A ALDH é considerada um novo marcador tumoral para CSCs e está relacionada com mau prognóstico em doentes com o sub-tipo triplo-negativo [230, 231].

A osteopontina está a ser estudada como um potencial biomarcador de carcinomas agressivos, mas com resultados muito inconsistentes [232].

Os perfis de expressão génica identificam diversas “assinaturas moleculares” com relevante valor prognóstico e de valor preditivo [66, 212, 223, 226]. Os genes envolvidos na proliferação, angiogénese e metastização tumoral, potenciados pela análise matemática, permitem estimar o prognóstico dos doentes e o risco de recorrência e melhoram a graduação dada pela classificação histopatológica, sendo amplamente aplicados em clínica oncológica humana [66, 226]. Mais recentemente, a concentração de células inflamatórias infiltradas no tumor mamário, definida por IHC, bem como a expressão de metagenes de linfócitos B e plasmócitos e a expressão de genes relacionados com o estroma tumoral são áreas científicas em grande desenvolvimento e de provável valor prognóstico [226]. Os padrões de metilação identificaram cinco grupos distintos de metilação de DNA e dez grupos diferentes de cancro de mama, cada um relacionado com uma determinada evolução clínica. Os painéis de prognóstico molecular, baseados na expressão de mRNA, como Oncotype Dx, PAM50 e MammaPrint emergiram com potencial utilidade clínica [55]. A heterogeneidade dos tumores entre indivíduos, tanto no espaço como no tempo, está cada vez mais caracterizada [27, 43, 66]. A utilidade clínica dos perfis de expressão génica não é consensual e os seus potenciais benefícios estão restritos a escassos doentes com neoplasia mamária [171]. No entanto, dada a sua rápida evolução e redução de custos, é de esperar que a caracterização molecular seja mais utilizada no futuro [171].

Entre os humanos e os animais há semelhanças e diferenças que devem ser consideradas em oncologia comparativa e experimental, como os receptores hormonais, os marcadores tumorais, a caracterização patológica convencional, a caracterização por IHC e a transcriptómica [36]. Na glândula mamária humana e dos canídeos as células epiteliais luminais são caracterizadas pela expressão de citoqueratinas como a CK8, CK18, CK19 e CK27, enquanto que as células mioepiteliais expressam, variavelmente, as citoqueratinas basais CK5, CK6, CK14 e CK17, para além de outros marcadores como actina de músculo liso, calponina, vimentina e p63 [36]. Durante a transformação celular e o desenvolvimento tumoral, a maioria dos marcadores específicos de diferenciação celular parecem permanecer, o que permite usar estas proteínas como marcadores em tumores caninos e humanos [36]. O valor do cão e do gato em oncologia translacional de mama prende-se com a enorme semelhança no que respeita a genes críticos, como o *BRCA1*, *BRCA2* e *p53*, vias de sinalização envolvidas na carcinogénese como KRAS ou Wnt e os factores de prognóstico como PR, E-caderina e P-caderina [5]. No entanto, a uniformidade de procedimentos na caracterização histopatológica, molecular e genética nestes animais é fundamental para a correcta comparação entre os diversos estudos [6]. Não obstante do cão e do gato serem incluídos em bons modelos de investigação [6], os carcinomas mamários do cão têm frequentemente uma componente mioepitelia e carecem de alguns elementos de prognóstico contemplados na classificação dos tumores em mulheres. Por isso a sua reclassificação deverá contemplar as devidas diferenças moleculares e com fortes critérios na padronização da imunohistoquímica [5, 36].

As terapêuticas oncológicas convencionais, como a terapia adjuvante, passam sobretudo pelas opções farmacológicas conferidas aos doentes após a remoção cirúrgica de todos os focos de doença detectáveis [152]. O objectivo é eliminar as micrometástases, aumentar a sobrevida e eventualmente curar doentes com neoplasias clinicamente indetectáveis [152].

Em humanos, a aplicação de quimioterapia adjuvada é considerada a maior causa de declínio na mortalidade por cancro de mama no Ocidente [226]. As decisões terapêuticas são baseadas em factores clínicos como a idade, as co-morbilidades ou o estado geral, e em variáveis patológicas como o tamanho do tumor, o envolvimento dos gânglios linfáticos, o grau histológico, a existência de receptores de estrogénio, de progesterona e HER2 e ainda a intensidade de proliferação tumoral [226]. Estes factores de variabilidade podem ser combinados em algoritmos que sustentam as linhas de orientação emitidas pelas principais sociedades de oncologia médica no Ocidente [226]. No entanto, é patente que muitos doentes assim tratados têm escassas probabilidades de sucesso com manifesta toxicidade, o que motiva a investigação de terapêuticas mais eficazes [226]. A determinação do genoma dos tumores de mama tem levado à descoberta de fármacos muito dirigidos à inibição das vias de proliferação e de diferenciação que conferem vantagens aos tumores de mama, numa escalada que se aproxima da “terapêutica personalizada” [18, 27, 43, 213, 226, 233]. Neste âmbito, a terapêutica endócrina é um dos tratamentos mais eficazes em tumores ER positivo, ou seja dos subtipos luminal A e luminal B [27, 226]. O tamoxifeno é o fármaco endócrino por excelência, que induz a modulação selectiva do receptor de estrogénio, pelo que é considerado de acção anti-estrogénica, muito eficaz nestes tumores [66, 226]. A terapia endócrina adjuvante em mulheres em pós-menopausa como os inibidores da aromatase, anastrozole, letrozole e exemestane, bem como os agonistas da hormona libertadora da hormona luteínica para mulheres pré-menopausa, permitem combinações que aumentam as opções

terapêuticas e prolongam a sobrevida [27, 66, 226]. No entanto, e dada a heterogeneidade dos tumores luminais, a resistência à hormonoterapia existe e depende da expressão de genes envolvidos com a proliferação celular, entre outros [27, 214]. Essa análise genética é importante para estabelecer não só a taxa de recorrência, como também a sensibilidade à quimioterapia citotóxica neoadjuvante com alquilantes, antraciclina e antraciclina/taxano [27, 213, 214]. Apesar da expressão de ER ser dinâmica e poder ser afectada pela pressão selectiva da endocrinoterapia, as vias de sinalização com factores de crescimento como o EGFR, HER e *PIK3CA* estão igualmente implicadas na quimioresistência [27, 213, 214]. A expressão destes factores é mais comum no subtipo luminal B do que no subtipo luminal A e nesses casos o everolimus com letrozole tem um efeito antiproliferativo [27, 213, 214].

Para doentes com neoplasia de mama HER2 positivo, o trastuzumab, um anticorpo monoclonal anti-HER2, é o tratamento mais eficaz [27, 226]. O lapatinib e o pertuzumab variam do trastuzumab numa série de mecanismos importantes para a sensibilidade e resistência [27, 213, 214].

Os tumores de mama do sub-tipo basal ou triplo-negativos carecem de alvos terapêuticos [27]. Estes tumores dependem do EGFR para o crescimento e proliferação, no entanto os inibidores desta via bioquímica não tiveram o sucesso esperado [27]. Pensa-se que via do *BRCA1* inclui também outros genes relacionados com a reparação do DNA, particularmente em recombinação homóloga que, uma vez alterados, activam outras vias de reparação do DNA mais susceptíveis a erros, por exemplo a via que envolve a enzima poli(ADP-ribose) polimerase (*poly(ADP-ribose) polymerase*, PARP) [27]. A inibição da PARP induz morte celular em tumores com disfunção do *BRCA1* de modo que o desenvolvimento de inibidores da PARP, assim como os tratamentos à base de platina, indutor de quimiossensibilidade, têm-se mostrado promissores havendo muito interesse no seu estudo e desenvolvimento [27, 213, 226, 233, 234].

Os agentes terapêuticos anti-angiogénicos são uma das inovações mais promissoras da última década no tratamento do cancro de mama [27, 151, 226, 233]. O bevacizumab, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, é o mais conhecido com uma sobrevida encorajadora [27, 151, 152, 226, 233].

A radioterapia (RT) é uma componente essencial do tratamento oncológico da mama [235]. O objectivo da RT é erradicar lesões neoplásicas microscópicas após a remoção cirúrgica do tumor ou da mama. As áreas com maior risco de recorrência pós-cirúrgica são o leito tumoral quando apenas o tumor é removido, a parede torácica na mastectomia e os gânglios linfáticos regionais [235, 236]. A finalidade da radioterapia, bem como a sua aplicação, depende do estado da doença oncológica [235, 236]. Em casos de mamas com tumores singulares, a exérese cirúrgica seguida de RT permite níveis de controlo e sobrevivência semelhantes à mastectomia [236]. Também em casos de tumores únicos de dimensão elevada, relativamente ao tamanho da mama, a RT é usada com vista à redução tumoral para posterior cirurgia [236]. Qualquer tratamento cirúrgico por mastectomia, com ou sem reconstrução imediata, é complementado por RT da parede torácica que visa reduzir o risco de recidiva locoregional [235]. Esta modalidade terapêutica é normalmente associada à cirurgia e à terapia sistémica adjuvante, pelo benefício na redução o risco de metastização, e melhora a sobrevida dos doentes bem como a sua qualidade de vida [235]. No entanto o risco de recorrência tumoral local, regional e distante existe e prende-se com os factores de prognóstico como o tamanho do tumor, o grau tumoral, o estado das margens tumorais, o envolvimento dos gânglios linfáticos tumorais, o estado dos receptores de

estrogénio, de progesterona e HER2 e a idade do doente [235]. Nos últimos 20 anos, a radioterapia teve um progresso acelerado que passou da optimização locoregional para o planeamento tridimensional do volume de interesse, calculado por tomografia computadorizada complexa [237]. A terapia volumétrica modulada por arco é uma nova técnica de radiação com rotação de 360º com vantagens sobre a radioterapia convencional modulada por campo de intensidade estática, uma vez que reduz o tempo de tratamento, tem maior precisão na distribuição conformacional da dose pelo volume tumoral, reduzindo assim o risco para os órgãos e tecidos adjacentes. A sua aplicação está a aumentar significativamente no tratamento do cancro de mama [16, 235, 237].

A terapêutica cirúrgica está menos invasiva e mais personalizada [16]. A cirurgia mamária e a oncoplastia evoluíram no sentido da máxima conservação da mama e do aperfeiçoamento da sua reconstrução [16]. A intervenção axilar tem sido menos extensa já que o seu valor se prende sobretudo com a informação prognóstica para orientar a terapia adjuvante [16].

Terapêuticas emergentes - Termoterapia

O futuro do tratamento do cancro de mama passa sobretudo pela implementação de planos individualizados sem o envolvimento de cirurgia [16]. Em terapêutica oncológica, a termoterapia focal é uma modalidade antiga na história da humanidade, que tem reunido maior ou menor consenso, em função da evidência clínica e da evolução da tecnologia [238, 239].

Em sentido *lato*, o termo hipertermia refere-se a uma febre anormalmente elevada ou ao tratamento de uma doença por indução de febre ou ainda por aplicação de calor a partir de uma fonte externa [155]. São sinónimos de hipertermia, os termos terapia térmica e termoterapia [240]. De forma mais precisa, pode ser definida como a elevação da temperatura corporal normal até ao intervalo térmico entre 41-44°C por um período definido de tempo [155, 240-244]. Em geral, *in vitro*, a termossensibilidade das células normais e neoplásicas é a mesma, no entanto, *in vivo*, verifica-se que há grande selectividade na eliminação das células tumorais, sensibilidade essa que está relacionada com a fisiologia e neovascularização dos próprios tumores [155, 244]. Por exemplo nas neoplasias, a arquitectura dos neovasos é caótica com regiões tumorais em hipóxia e acidose onde o pH chega a valores entre 2 e 4, o que torna as células mais sensíveis ao intervalo térmico usado em termoterapia [244]. Em temperaturas mais elevadas, superiores a 45°C, as células entram em necrose de coagulação, no intervalo entre 60-90°C dá-se a termoablação e acima dos 200°C os tecidos entram em carbonização [245].

A utilização clínica da hipertermia no sistema de medicina tradicional indiano, Ayurveda, data de há 3000 anos, fazendo parte de um protocolo chamado de “Panchakarma” usado para prevenção e cura [246]. Hipócrates (540-480 A.C) dizia que as doenças que não curavam pelo calor eram incuráveis [247] e usava a areia quente do Verão para aquecer os pacientes [242]. Parménides, filósofo Grego e médico dizia -“dêem-me o poder de gerar febre e curo qualquer doença” [242]. O tratamento do cancro com hipertermia foi primeiramente referido pelo Romano Cornelius Celsus Aulus (25 AC-50 DC) que notou que os primeiros estadios de cancro são extremamente termossensíveis [242]. Na idade média, a hipertermia foi descrita por Nicolaus Leonicensis (1428-1524), professor de medicina em Pádua. A febre era considerada um agente de purificação e destoxificação do corpo [242]. Após o renascimento há relatos de regressão espontânea de tumores em doentes febris por varíola, influenza, tuberculose e malária [242]. O entusiasmo na aplicação do calor diminuiu depois de 1537, quando Ambroise Paré, cirurgião militar, demonstrou que o tratamento médico com cauterização tinha consequências inaceitáveis [242]. Em 1779, Dr. Kizowitz descreveu o efeito do aquecimento nos tumores malignos causados pela malária. Na literatura moderna, a hipertermia surge como coadjuvante de outras terapias ou como modo primário de erradicação. Em 1886, Bush, W publicou um artigo sobre hipertermia, onde a cura de um sarcoma é associado à febre causada por erisipela [242, 247, 248]. Na mesma altura, Coley, um americano que desconhecia Bush, obteve resultados muito semelhantes e promissores quando infectou doentes oncológicos com a “toxina de Coley”, composta pelas bactérias *Serratia marcescens* e *Streptococcus*, ambos inactivados pelo calor, como forma de induzir febre alta [247-249]. Uma década mais tarde, Westermarck usou água quente para tratar cancro cervical inoperável com bons resultados, iniciando a hipertermia localizada [242, 249] e chamou a atenção para as diferenças de termossensibilidade

em função do estado de oxigenação das células [241]. Banhos quentes, electrocautério e diatermia cirúrgica eram usados para elevar a temperatura local dos tumores. No início do século XX, a investigação básica e clínica em hipertermia era desenvolvida, mas os métodos de gerar e de medir o calor eram poucos para se alcançarem resultados clínicos positivos e a termoterapia caiu em desuso [242]. Em 1967, Cavalier et al. sugere que a hipertermia estimula uma resposta imunitária anti-tumoral em tumores imunogénicos [250]. O primeiro congresso de hipertermia oncológica, em 1975, fez renascer o interesse por esta modalidade terapêutica [241-243, 251]. Nos anos 80, tanto dos Estados Unidos da América como na Europa e Japão, surgiram sociedades e grupos de investigação em termoterapia [242]. Desde então, e com o impulso das nanotecnologias, a hipertermia conta com mais de 60 mil publicações só nos últimos dez anos, em áreas tão diversas como biomateriais, oncologia ou genética, o que demonstra bem a amplitude de interesse e a multidisciplinaridade que abrange. Ainda assim, a sua aplicação prática é escassa e restrita a países como Áustria, China, Alemanha, Itália, Japão, América do Norte, Suíça e Holanda [240]. Os principais motivos da diminuta aplicação em oncologia humana prendem-se sobretudo com os resultados controversos, com a dificuldade em atingir a temperatura terapêutica, a exigência na monitorização intensiva dos doentes e a falta de experiência e de dados estatísticos [240]. Assim, os maiores desafios actuais prendem-se com a melhoria da tecnologia de aquecimento, termometria, desenvolvimento de modelos de planeamento hipertérmico e, mais recentemente, o desenvolvimento de nanopartículas transportadoras de medicação termosensitiva e lipossomas [240]. O aumento do conhecimento dos efeitos biológicos das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs) e da imunologia oncológica permitiram uma grande melhoria dos resultados que justificam um entusiasmo renovado por esta modalidade terapêutica (Figura 34) [238, 240, 252, 253].

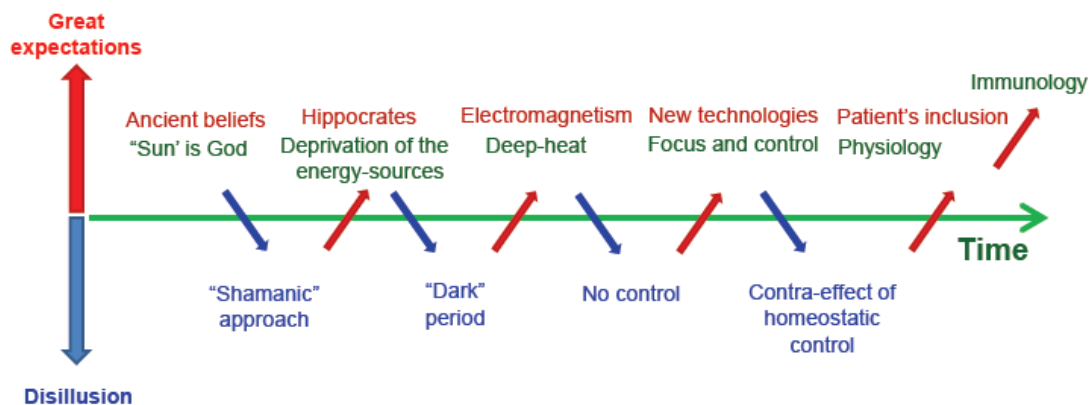


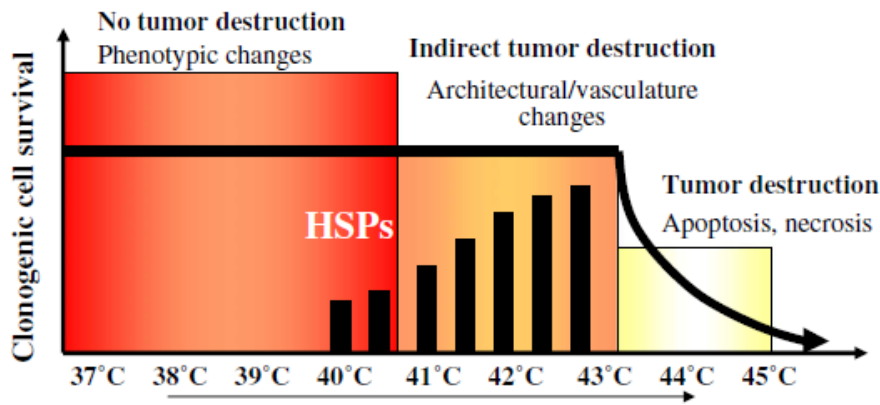
Figura 34 – História da hipertermia em oncologia. Adaptado de Szasz, 2014 [238].

Em todo o mundo, a aplicação da termoterapia em clínica oncológica é limitada a um número muito restrito de unidades médicas. De forma mais comum, é utilizada em associação com quimioterapia e radioterapia, já que torna as células mais quimiossensíveis, permitindo uma redução das doses administradas, e mais radiosensíveis, o que aumenta a eficácia da radiação [242, 243, 253]. O resultado desta combinação é uma melhoria terapêutica acompanhada por taxas melhoradas de controlo local de tumores e melhores

cuidados paliativos e de sobrevivência. Os tumores de bexiga, mama, cérvix, cabeça e pescoço e sarcomas de tecidos moles são especialmente termossensíveis [241, 253, 254]. A hipertermia, à parte de todos os benefícios oncológicos, ainda carece de aceitação por parte de muitos centros já que, frequentemente, os resultados são inconsistentes e insatisfatórios [254, 255] e um dos principais motivos é a indefinição relativamente à dosimetria térmica [254]. A maioria dos tumores não é alcançável com a tecnologia hipertérmica actual e para aqueles que o são, a distribuição homogénea da temperatura não é assegurada, bem como a sua monitorização [255]. Para uma aplicação mais abrangente é muito importante a clarificação dos mecanismos subjacentes ao aquecimento, bem como os seus riscos e limitações [155, 238, 240].

Alterações funcionais decorrentes da termoterapia

A aplicação de calor causa alterações subtis na fisiologia dos tecidos, é fracamente mutagénico, inibe a síntese de macromoléculas e altera a integridade do citoesqueleto [247]. O comportamento dos tumores sujeitos a hipertermia envolve factores celulares e factores dependentes do hospedeiro [256], verificando-se grande sinergia com a radioterapia e a quimioterapia na destruição das células malignas (Figura 35) [247]. O efeito anti-tumoral directo prende-se com a indução de degenerescência ou de necrose em células cancerosas com prejuízo mínimo em células normais [155, 241]. Indirectamente, a aplicação da hipertermia focal conduz à regressão das neoplasias por indução de alterações fisiológicas relacionadas com factores como a lesão aos microvasos, lesões de reperfusão isquémica, peroxidação lipídica, activação de macrófagos, expressão alterada de citocinas e modulação da resposta do sistema imunitário (Figura 35) [242, 257, 258]. O estroma envolvente é um factor crítico da termossensibilidade, já que o pH ácido aumenta a actividade lítica da hipertermia [241, 259]. Os efeitos do calor nos tecidos dependem da energia total aplicada, da taxa de dissipação do calor e da sua termossensibilidade específica. Também a forma, volume e tipo de tecido e a homogeneidade da distribuição da temperatura podem afectar a desnaturação das células e de elementos sub-celulares [155, 240].



Molecular response	Cell cycle; DNA repair Induction of heat shock proteins/HSP-70 membrane expression	Apoptosis/Necrosis
Clinical setting	Thermosensitisation for chemotherapy and/or radiation	

Figura 35 – A elevação da temperatura e os efeitos anti-tumorais directos e indirectos. Acima da temperatura normal em humanos, 37°C, a elevação térmica até ao limite sub-letal de 43°C, induz a expressão de HSPs. No intervalo hipertérmico, 41-43°C, ocorre um aumento do afluxo sanguíneo, o que é sinérgico com a quimioterapia e a radioterapia, e também alterações fisiológicas que, indirectamente, levam à eliminação das células neoplásicas. A partir dos 43°C, a apoptose e a necrose são os factores que directamente contribuem para a destruição tumoral. HSPs, *Heat shock proteins*. Adaptado de Issels, 2008 [260].

A hipertermia interfere com o ciclo celular consoante a fase em que este se encontra [247]. A fase G1 é a mais termorresistente e as fases M e S as mais termossensíveis [241, 261, 262], sendo esta última a mais radioresistente [251]. Em hipertermia, a síntese de RNA é inibida, assim como a síntese de DNA e a actividade das suas enzimas de reparação [240]. Especificamente em linhas celulares de carcinoma de mama detectaram-se diferenças na expressão de genes relacionados com a progressão do ciclo celular, histonas e RNAs não codificantes, supostamente implicados na termossensibilidade selectiva destas células relativamente às células alveolares ditas normais [261].

Os lisossomas são destruídos selectivamente nas células malignas levando à perda do citoplasma e do núcleo [241, 242] enquanto nas células normais há apenas um ligeiro aumento da sua actividade [241]. Nas proteínas intracelulares, verifica-se uma paragem da síntese proteica, desnaturação proteica, agregação das proteínas na matriz nuclear, bloqueio do transporte transmembranar e da transdução de sinal e indução de síntese de HSPs [155, 240, 247, 262]. Há ainda alteração da fluidez e da estabilidade membranar, da forma da célula e do potencial de membrana, para além de uma modulação do efluxo membranar por bombas e indução de apoptose [262]. Após um evento hipertérmico ocorrem alterações nos ácidos nucleicos. A proteína p53 é sobreexpressa, causando paragem em G1 para reparação do DNA ou, se a reparação for mal sucedida, a p53 sai no núcleo para a mitocôndria e activa as caspases que desencadeiam a apoptose [262]. Este tipo de morte celular programada não desencadeia inflamação nem estimulação imunitária, já que as componentes antigénicas intracelulares são envolvidas por membrana citoplasmática, e por isso escapam à apresentação antigénica [263]. Já no caso da morte celular por necrose, a imunidade pode ser estimulada se, durante o

processo degenerativo-necrótico, houver preservação e libertação de vários padrões moleculares associados a lesões (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs) [264]. O sistema imunitário reconhece DAMPs através de uma série de receptores membranares ou citosólicos que identificam grupos proteicos em grande mobilidade como as HSPs e produtos intracelulares, libertados por necrose para o meio extracelular [264]. Uma vez estimulados, estes receptores induzem a produção de pró-IL-1 β e pró-IL-18 que podem ser clivadas para a forma activa através do complexo caspase 1 associado à activação de complexos de inflamassomas [264]. A libertação de IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória muito potente que está no início das respostas imunitárias, promovendo a chegada local de neutrófilos, a maturação de células dendríticas, contribui para a sensibilização dos linfócitos T CD8 ou citotóxicos, induz a diferenciação de linfócitos T CD4 ou auxiliares e a produção de TNF- α e das citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-12 [106, 263-266]. A IL-1 promove a inflamação e a angiogénese em ambientes em hipóxia, o que lhe confere propriedades tumorigénicas mediadas por inflamação [106].

Assim, as terapêuticas envolvidas na produção de DAMPs estimulam o sistema imunitário inato, sendo seguido pelo reconhecimento e apresentação de antígenos associados ao tumor, por células dendríticas, aos linfócitos T CD8 que, por sua vez, desencadeiam uma resposta citotóxica adaptativa [264, 267]. Durante a hipertermia, este é o mecanismo pelo qual a libertação de HSP livres e HSPs complexadas com antígenos (Figura 36), pode estimular a imunidade anti-tumoral. Muitas destas proteínas ligam-se a APCs que fagocitam os complexos HSP-antígenos tumorais e apresentam-nos a linfócitos T permitindo o início de uma resposta imunitária adaptativa que culmina com a apoptose celular [262, 263, 266-268].

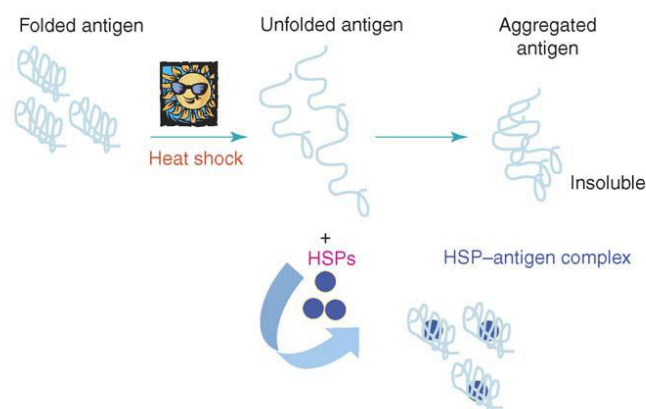


Figura 36 – Formação de complexos formados por HSPs e antígenos tumorais em condições de hipertermia. O calor leva à abertura de antígenos purificados com exposição de resíduos hidrofóbicos capazes de se ligar a HSPs. HSPs, *Heat shock proteins*. Adaptado de Segal, 2006 [263].

Além das HSPs, as células tratadas libertam ainda exosomas contendo antígenos e quimiocinas que ajudam a recrutar APCs e linfócitos T para o tumor, para além de células do sistema imune inato como granulócitos, neutrófilos, células NK, monócitos e células dendríticas [262, 268]. As células aquecidas entre os 39.5 e 43°C expressam ainda níveis aumentados de MICA, um ligando NKG2, tornando as células neoplásicas mais susceptíveis à lise pelas células NK e ainda aumentam as moléculas de MHC I, tornando-as mais interactivas com os linfócitos T citotóxicos (Figura 37) [268]. Deste modo, a hipertermia altera a “visibilidade” do tumor para o sistema imunitário inato e adaptativo com desencadeamento de efeitos que resultam numa diminuição dos tumores tratados e metastisados [262, 269, 270].

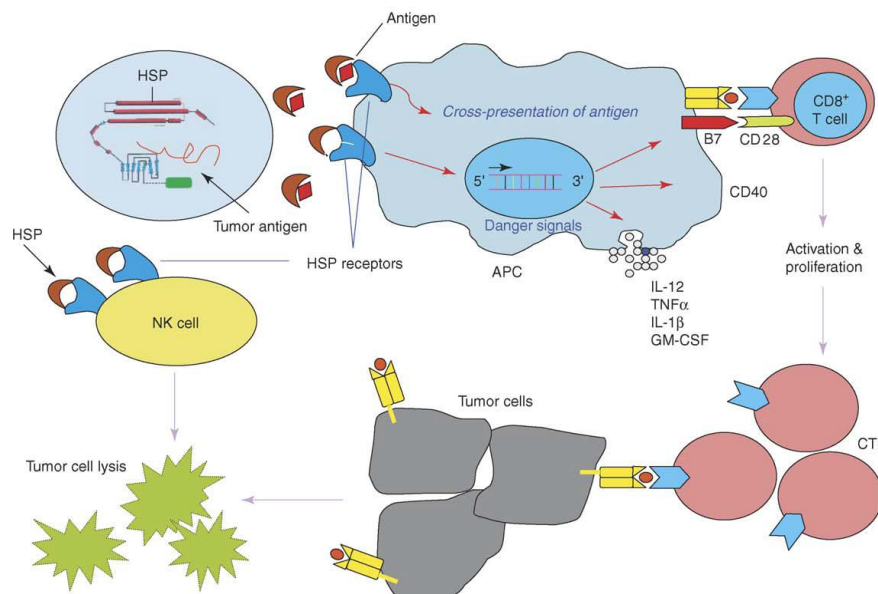


Figura 37 – As HSPs aumentam a apresentação de antígenos e a actividade das células NK com consequente lise das células neoplásicas. As HSPs são induzidas em situações de *stress* fisiológico, como febre e necrose celular, e activam as APCs necessárias para a iniciação de resposta imunitária primária e secundária. A actividade dos linfócitos T citotóxicos específicos de antígeno é iniciada causando a apoptose da célula. As células NK destroem directamente as células tumorais e aumentam a actividade das CTLs. APCs, *Antigen presenting cells*; CTL, *Citotoxic T lymphocyte*; HSPs, *Heat shock protein*; NK, *Natural killer*. Adaptado de Segal, 2006 [263].

As HSPs são as primeiras proteínas a serem sintetizadas em resposta ao calor [247]. Para além dos efeitos imunológicos já referidos protegem a célula de aquecimentos adicionais e aumentam a sua sobrevivência, ao que se denomina de termotolerância [242, 247, 256, 262]. Outros processos pós-translacionais de adaptação, como a paragem do ciclo celular na fase G2 e alterações do metabolismo contribuem para a resistência térmica, tendo este fenómeno uma comprovada dependência da temperatura a que as células são expostas [262]. A temperaturas <43°C, o desencadeamento de termotolerância relaciona-se com um aumento da sobrevivência celular [247, 262]. Já, a temperaturas >43°C há a inibição da termotolerância imediata e um aumento da mortalidade celular [262] devido à inibição da síntese proteica [247, 256]. A termotolerância desenvolve-se durante as 8-10h subsequente à aplicação de calor e decai durante 60-100h dependendo do tipo de tecido e da intensidade de termotolerância induzida [247].

Este fenómeno conduz ao aumento da curva de sobrevivência, onde existe a fase de indução, de desenvolvimento e de decaimento. Cada uma destas etapas depende da temperatura, pH e nutrientes disponíveis [247].

As HSPs são encontradas na maioria das células de mamíferos e, de um ponto de vista mais prático, são divididas em pequenas HSPs, com peso molecular <40kD, e em famílias com pesos moleculares de 60, 70, 87 e 110kD [247]. Todas estas proteínas são chaperonas, ou seja, ligam-se de forma não selectiva a sequências proteicas hidrofóbicas libertadas na desnaturação induzida, por exemplo pelo calor [262]. Por isso previnem a irreversibilidade da interacção com as proteínas circundantes, como as proteínas nucleares [262]. Em especial, a HSP 70 é reconhecida pela inibição de estímulos pró-apoptóticos especialmente durante as 48h seguintes a um tratamento hipertérmico [262]. O decaimento das HSPs mais pesadas está correlacionado com o decaimento da termotolerância e a sobrevivência das células [247]. Em pH ácido, a intensidade desta sobrevivência é reduzida e a sua diminuição é mais acelerada em células em mitose, tal como em contexto tumoral [247]. Em suma, as HSPs são libertadas por todas as células em condições de exigência funcional com acções conducentes à sobrevivência (Tabela 9), o que em contexto oncológico fomenta a resistência celular, sendo por isso necessário equacionar a sua estimulação [271].

Tabela 9 – Resumo das funcionalidades e dos efeitos celulares decorrentes da síntese das proteínas de choque térmico. Adaptado de Khalil, 2011 [271].

Promoção da sobrevivência por mecanismos de inibição	Promoção da sobrevivência por mecanismos de promoção
Envelhecimento Apoptose Proteínas com alterações conformacionais Proteínas desnaturadas	Vias de sinalização Imunomodulação Protecção celular

As alterações morfológicas nas células decorrentes da termoterapia incluem tumefacção endotelial, passagem de plasma para o interstício, microtrombocitose devido a activação da hemostase, e alterações da viscosidade das membranas celulares. Todos estes factores também promovem a hipóxia, a privação de nutrientes e a acidose intratumoral [262]. Imediatamente à aplicação da hipertermia observa-se que as células malignas diminuem o volume e entram em picnose [241]. Os efeitos causados pelo aquecimento incidente na neovascularização tumoral, que é formada por capilares tortuosos dilatados [151], carentes de músculo liso e de pericitos convencionais, são muito diferentes dos que se verificam em vasos sanguíneos ditos normais, onde um aumento da temperatura sempre aumenta o aporte sanguíneo e de oxigénio às células [259]. Nos tumores, há uma grande heterogeneidade na vascularização pelo volume tumoral, não sendo incomuns áreas hipovascularizadas [272]. Durante a exposição a hipertermia moderada, <42°C, o fluxo sanguíneo no tumor aumenta, um processo que torna esta modalidade sinérgica com a radioterapia e a quimioterapia [262]. Pelo contrário, quando o aquecimento eleva a temperatura acima dos 43°C, ocorre uma diminuição do fluxo sanguíneo ou até estase completa [242, 247, 262]. Estas características tornam a vascularização tumoral menos eficaz à dissipação do calor e mais susceptível de dano hipertérmico (Figura 38). Adicionalmente, em microambientes ácidos e em hipóxia, o que se verifica frequentemente no interior dos tumores sólidos, o calor

é mais eficaz em promover a lise celular com manutenção da integridade das células normais [242, 259, 262, 270, 273]. Ainda assim, a recuperação do volume vascular ocorre entre 24-48h após o aquecimento, altura em que se pode planejar um novo tratamento hipertérmico [247].

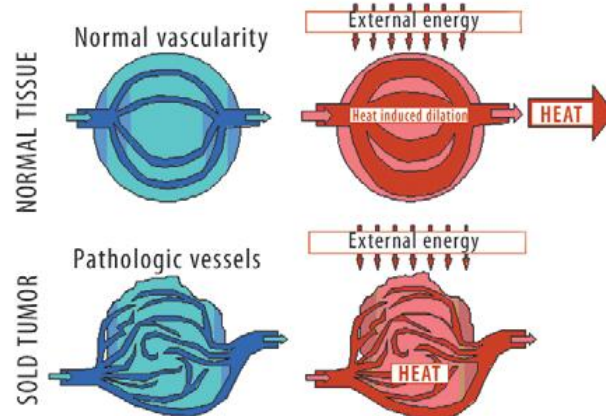


Figura 38 – Mecanismo de sobreaquecimento tumoral. O aquecimento aplicado a tecidos normais causa a dilatação dos vasos sanguíneos de modo a diminuir a temperatura dos tecidos. Em tecidos tumorais os vasos sanguíneos são tortuosos e não dilatam, alguns colapsam, e o calor não é evadido pelo efluxo, o que aumenta selectivamente a temperatura na geometria tumoral. Adaptado de Chichef, 2007 [245].

Hipertermia em aplicação singular e em sinergia com outras modalidades terapêuticas oncológicas

Existe uma hipertermia fisiológica que serve de base a tratamentos de dor, tensões e distensões [155]. Neste âmbito, a temperatura aplicada é inferior a 41°C durante uma hora em múltiplas sessões e a aceleração dos processos curativos passam pelo aumento do afluxo de sangue e pelo aumento do metabolismo local [155]. Em temperaturas acima de 42,5-43°C, por cada 1°C de elevação, o tempo de exposição pode passar a metade, mantendo-se a equivalência de morte celular com a vantagem de que maioria dos tecidos normais não é afectada por tratamentos de uma hora a temperaturas até 44°C [155].

Três modalidades de termoterapia existem consoante a abrangência corporal de aquecimento, sendo a sua aplicação dependente do tipo de tumor e da tecnologia disponível. Assim, reconhecem-se a termoterapia local, durante a qual o calor incide apenas no tumor, a termoterapia regional, quando se aquece a região corporal que detém o tumor e ainda a termoterapia em todo o corpo [155, 245]. Os tumores onde se aplica hipertermia em combinação com radioterapia ou quimioterapia são variados [262] e vão desde tumores externos da cabeça e face [274], tumores malignos cutâneos, como o melanoma maligno [247, 251, 275], recidivas de cancro de mama na parede torácica [247], carcinomas localmente avançados no cérvix [276, 277] e próstata [278], carcinoma de bexiga não invasivo do músculo [279], carcinoma recorrente do ovário [280, 281], sarcomas de tecidos moles [282], entre outros (Tabela 10).

Tabela 10 – As aplicações da termoterapia em oncologia. Adaptado de Chichel, 2007 [245].

Tipos de hipertermia	Tipo/local do tumor	Aplicações clínicas	Tipo de energia/equipamento
Hipertermia local Superficial Intracavitária Intraluminal Intersticial	Tumores superficiais Tumores intracavitários Tumores intraluminais Tumores intracranianos	Neoplasias da cabeça e pescoço Carcinoma de mama recorrente ou localmente avançado Gliomas malignos Carcinomas do recto Carcinomas do esófago Sarcomas dos tecidos moles	Microndas Radiofrequência Ultrassons Fontes de aquecimento: Perfusão com água quente Implantes metálicos resistivos Implantes ferrimagnéticos Nanopartículas
Hipertermia regional Abdominal Pélvica Membros	Tumores profundamente localizados Tumores localmente avançados	Carcinoma cervical Carcinoma rectal Carcinoma vesical Carcinoma prostático Sarcoma de tecidos moles Carcinoma do ovário Mesotelioma Carcinomatose peritoneal	
Hipertermia em todo o corpo	Tumores disseminados /metastisados	Melanoma maligno Sarcomas recorrentes de tecidos moles Carcinoma do ovário	Radiação infravermelha Cobertores de água quente Câmaras térmicas

A hipertermia focal como modalidade terapêutica oncológica oferece uma abordagem eficaz com poucos efeitos secundários em comparação com a quimioterapia e a radioterapia [155].

O volume de interesse que pode ser aquecido depende das características físicas da fonte de energia e do tipo de aplicador [244] sendo que o objectivo é aquecer apenas o tumor através de métodos externos, intraluminais e intersticiais [245]. Utilizada como modalidade terapêutica única tem uma eficácia moderada, dependente da temperatura e da duração do tratamento, verificando-se frequentemente regressão espontânea ou até irradicação dos tumores, contudo de modo provisório [155, 256]. Os candidatos à hipertermia local são tumores recidivantes da parede torácica, melanomas malignos superficiais e metástases em gânglios linfáticos na cabeça e pescoço [155, 242]. Durante o tratamento hipertérmico, a temperatura deve ser elevada até ao limite da tolerância dos tecidos normais circundantes [244] e a distribuição do calor deve ser homogénea porque a elevação da temperatura local em 1°C duplica o efeito térmico destrutivo [155, 249]. As técnicas electromagnéticas são geralmente usadas em tumores superficiais menores do que 4 cm de espessura como as neoplasias da mama, enquanto os feixes de ultra-sons são úteis para tumores com aproximadamente 6 cm [240, 242]. A hipertermia local, intraluminal ou endocavitária pode ser usada para tratar tumores localizados dentro das cavidades ou nas suas proximidades [155, 245]. Antenas endocavitárias são inseridas nas aberturas naturais ou em órgãos cavitários como a árvore brônquica, órgãos ginecológicos e urinários tubulares e gastrintestinais [283]. A hipertermia local intersticial é usada para tumores profundos como os tumores cerebrais, onde, sob anestesia, são inseridas no tumor sondas ou agulhas aferidas por imagiologia no tumor. Este tipo de termoterapia tem o objectivo de induzir a termoablação por aumento da temperatura local acima dos 45°C [240].

A terapia regional incide numa área corporal maior como o tórax ou pélvis onde a lesão neoplásica esteja inserida. As técnicas utilizadas atingem temperaturas entre 39-42°C [242] como a energia de radiofrequência ou de microndas focadas na área em tratamento [240]. A hipertermia regional por perfusão é aplicada num membro [241, 249], órgão ou cavidade corporal com fluidos aquecidos e a aplicação mais frequente é a perfusão intraperitoneal com quimioterapia associada para tratamento de carcinomatose peritoneal [245].

A hipertermia com aquecimento de todo o corpo [241, 249] eleva a temperatura até aos 39,5°C durante 4-8h ou até aos 42°C durante 1-2h [242, 256]. As fontes de calor podem ser extracorporais ou endocorporais. Em qualquer método, a monitorização do doente tem de ser rigorosa [256]. Nesta modalidade a temperatura tumoral é mais homogénea e, ao contrário da hipertermia local ou regional, onde o sangue arrefece o tumor, na hipertermia de corpo inteiro, o sangue fornece o aporte de energético para a massa neoplásica [240]. A hipertermia de corpo inteiro não altera os tecidos normais, desde que a temperatura seja inferior a 43°C. No entanto, devido a diferenças regionais características de alguns tecidos, temperaturas mais elevadas podem ocorrer. O resultado desse excesso são queimaduras, bolhas ou dor. Outras complicações transitórias incluem diarreia, náuseas, vômito e infertilidade temporária nos homens. Os critérios de exclusão para hipertermia são doentes com marcapasso (*pacemaker*) cardíaco electrónico ou doentes com tumores próximos de estruturas metálicas como próteses [242, 247].

A utilização conjunta da hipertermia moderada com a radioterapia resulta num efeito sinérgico para ambas as modalidades, reconhecida como radiosensibilização [244, 262]. Na radioterapia, a radiação ionizante gera ROS genotóxicos lesivos em células radiosensíveis, no entanto as células em hipóxia e acidose, ou que se encontram em fase S do ciclo celular, são relativamente radioresistentes, o que constitui uma desvantagem para o sucesso terapêutico em oncologia [242, 262]. Uma estratégia para aumentar a percentagem de células eliminadas por radiação ionizante passa pela suplementação adicional de sangue e oxigénio ao tumor, o que é alcançado pelo aquecimento <42°C [247, 249, 255, 262], daí que a hipertermia moderada aumente a eficácia da radioterapia [262]. Mais ainda, o aquecimento inibe os mecanismos de reparação do DNA e por isso aumenta os efeitos da radioterapia e ainda promove a libertação de HSPs [247]. O resultado da sinergia entre estas duas modalidades é o aumento do controlo local dos tumores, da progressão clínica e da sobrevivência [242, 247, 256].

À semelhança da radiosensibilização, a quimiossensibilização é a utilização conjunta de hipertermia moderada com quimioterapia. Esta sinergia sensibiliza as células malignas a agentes citotóxicos e até converte alguns fármacos inócuos à temperatura normal, em fármacos altamente lesivos a temperaturas de 41-43°C [247, 249, 262]. A elevação da temperatura acelera o modo primário de acção química: alquilação, quebra proteica, geração de ROS ou quebra de cadeias de DNA [262]. Outros efeitos passam pelo aumento dos poros vasculares da neovasculatura ou o aumento da permeabilidade da membrana celular, o que favorece a absorção dos fármacos quimioterapêuticos pelas células neoplásicas, e interfere ainda com a farmacocinética, distribuição, metabolismo e excreção destes agentes por alteração do fluxo sanguíneo hepático e renal [262]. O aparecimento de quimioresistência em alguns tratamentos a temperaturas ditas normais ou moderadas pode ser revertido através de compostos de platina a temperaturas >42°C [262]. Os lipossomas termosensíveis, transportadores de agentes terapêuticos em combinação com hipertermia são também muito

promissores [284]. A tripla modalidade, com radioquimiossensibilização, é ainda mais potenciadora dos efeitos individuais em humanos [256] e em animais [285].

A terapia génica é um tipo de tratamento em que é introduzido material genético nas células para aumentar ou modificar a sua função, através da síntese de proteínas com efeitos terapêuticos ou com possibilidade de interacção com outras substâncias que venham a exercer um efeito desejado [155]. A combinação de terapia génica com hipertermia induz a expressão de transgenes que activam vias de morte celular programada [286-288]. Para se alcançar o tratamento oncológico eficaz, o material genético deve actuar apenas nas células neoplásicas ou nas células associadas ao tumor, salvaguardando as células normais, sem inibir a resposta imunológica [155]. A construção de lipossomas com vectores virais e não-virais estão em teste em numerosos estudos de terapia génica nos quais a expressão génica é induzida pelo calor [286, 289]. A combinação bem-sucedida de hipertermia com esta nova modalidade, onde participam promotores de HSPs, está reportada em tumores de mama [290].

A termoterapia em utilização singular ou em qualquer uma destas combinações composta um risco geralmente baixo. A ocorrência de dor e queimaduras podem ser minimizadas com a utilização correcta das tecnologias de aquecimento. O estado de hidratação dos doentes também é crítico para evitar situações de hemoconcentração por desidratação. Também as células neuronais e da glia ficam alteradas por exposição térmica ligeira ou moderada, por isso a sua aplicação em tumores da cabeça e pescoço é muito exigente no que diz respeito ao planeamento da termoterapia [155].

Em medicina veterinária, a utilização da hipertermia teve um grande aumento desde os anos 80 do século passado [291]. A aplicação desta metodologia de modo singular tem sido benéfica no tratamento de tumores espontâneos de cão e gato, mas é amplamente aceite em associação com radioterapia [254, 292, 293]. Publicações descrevem os efeitos da hipertermia em tumores como o carcinoma das células escamosas, melanomas cutâneos fibrossarcoma do gato [294] e do cão [295], mastocitomas [296], linfossarcoma [285] e tumores perianais do cão, apesar de alguns efeitos secundários por queimadura [294] ou toxicidade [297]. Em cavalos, esta modalidade tem vantagens económicas e desportivas muito importantes no tratamento de tumores sólidos superficiais [298]. E, surpreendentemente, há indicação de que os cães com leishmaniose também podem ter benefícios clínicos com a aplicação de hipertermia [299, 300].

Tecnologias de aquecimento e de monitorização térmica

O fornecimento de energia térmica aos tecidos tumorais sem aquecimento excessivo dos tecidos normais é um pré-requisito importante na aplicação clínica da hipertermia [155]. A condução térmica por perfusão de sangue quente é a estratégia mais simples de aquecer um tecido até 3-5 milímetros de distância da fonte térmica, por exemplo água quente em contacto com pele ou cavidades corporais, ou ainda por colocação de fios, agulhas ou cateteres quentes nos interstícios [240].

Os métodos electromagnéticos predominam em hipertermia oncológica [155, 240]. Os mecanismos primários de aquecimento com energia electromagnética (EM) variam com a frequência e com os tecidos a serem tratados onde as propriedades eléctricas variam consideravelmente [240]. A geração de calor por hipertermia radiactiva usa ondas de frequência menores do espectro EM, como radiofrequência, microndas, infravermelhos próximos e distantes [240]. Das modalidades com radiação, a radiofrequência, que vai desde as centenas de kilohertz a alguns megahertz, é a que tem o comprimento de onda maior e por isso alcança maior penetração com mínimo aquecimento da pele e da gordura [249, 256]. A hipertermia radiactiva cria no tecido tumoral um campo eléctrico alternado induzindo movimentação dos electrões e deposição de potência que resulta das perdas relacionadas com a resistência dos tecidos à passagem de corrente eléctrica. Esta agitação iónica cria fricção e gera localmente calor, podendo este ser controlado através da modulação da radiofrequência [155, 301]. Ao contrário da radiação electromagnética, a deposição de energia por ultrassons envolve a propagação de ondas sonoras através dos tecidos, no intervalo de frequência entre 2-20 MHz, que se propagam como ondas de pressão. As variações de pressão entre forças compressivas e expansivas causam vibração e colisão entre as moléculas dos tecidos com produção de calor. Transdutores externos emitem ultrassons que penetram melhor na gordura do que no músculo [240] ou nos tecidos compactos, o que impossibilita a sua utilização em hipertermia oncológica [249, 301].

A hipertermia por indução magnética utiliza uma bobina localizada em torno de um tecido biológico que, quando atravessada por uma corrente alterna, aquece os tecidos profundamente, a mais de 5 cm [155]. Os campos magnéticos gerados na bobina induzem correntes em remoinho dentro dos tecidos, com um centro nulo. Estes aplicativos usam frequências de 13,56, 27,12 e 40 MHz [301]. A aplicação intratumoral de materiais magnéticos como micropartículas e segmentos de ferro permitem aumentar a absorção da energia magnética dentro do tecido [240]. Em frequências de microndas (de centenas de megahertz a aproximadamente 10 gigahertz) predominam as perdas dieléctricas nos tecidos e o aquecimento resulta primeiramente da fricção causada pelas interações entre as moléculas polares de água que rodam e oscilam para manter o alinhamento com a variação temporal do campo EM [256]. Em frequências superiores, a energia é depositada mais local e superficialmente, enquanto em energias inferiores a penetração é maior, o que atinge áreas corporais mais abrangentes [249, 256].

Um dos maiores obstáculos na aplicação da hipertermia é a obtenção de uma distribuição homogénea do calor [301]. A terapia do cancro baseada na nanotecnologia é uma forma especial de termoterapia intersticial com selectividade na deposição térmica em células tumorais [240, 302]. É estudada com recurso a campos de radiofrequência, luz infravermelha ou campos magnéticos alternados como fonte de deposição de energia [283]. Este método, também conhecido como hipertermia de fluxo magnético ou nanohipertermia, permite o aquecimento de nanopartículas de óxido de ferro através de um campo magnético externo induzido por uma corrente alterna, com claras melhorias na distribuição do calor para uma dada temperatura e durante o tempo desejado [268, 303]. A quantidade de calor gerado depende da natureza do material magnético e dos parâmetros do campo magnético. As partículas devem ser biocompatíveis, ter propriedades superficiais uniformes, apresentar boa estabilidade coloidal e permanecer focalmente distribuídas na região de interesse [302, 304]. Diversos desenhos de estrutura de nanopartículas ou de lipossomas termosensíveis estão em desenvolvimento para aquecimento ou para transporte de fármacos [305]. O MgO-Fe, formado a partir de

magnetite, Fe_3O_4 , é seguro e biocompatível o que faz desta molécula uma escolha comum em investigação [302, 306, 307]. A capacidade de aquecimento depende das propriedades do material como a anisotropia magnetocristalina, a sua microestrutura e o tamanho das partículas que penetram muito bem em células cancerígenas uma vez que medem, tipicamente, entre 10-100 μm de diâmetro [242]. Estas partículas ferrimagnéticas têm orientações ou momentos magnéticos permanentes e, uma vez localizadas no tumor e agitadas por um campo magnético alterno, geram calor pela perda de energia durante o relaxamento (histerese) e por rotação mecânica, o que conduz à destruição das células neoplásicas mantendo intactos os tecidos normais [242, 302] com a vantagem de se poderem efectuar tratamentos repetidos [155]. Dependendo da elevação da temperatura e da duração do tratamento, as células são destruídas directamente ou sensibilizadas para a aplicação simultânea de quimioterapia ou radioterapia [240].

A exposição das células a temperaturas crescentes entre 41-47 $^\circ\text{C}$ desencadeia uma curva dose-efeito definida pela morte celular durante a hipertermia [262] e a correspondente curva de sobrevivência mostra um típico “ombro” que reflecte o processo de eliminação celular [247, 262]. No início da exposição térmica, <42,5 $^\circ\text{C}$, as alterações celulares são sub-letais e reversíveis e isso reflecte-se numa linha praticamente inalterada do gráfico durante cerca de 2h a 4h, atribuída ao desenvolvimento de termotolerância, ao que se segue um crescimento exponencial da morte celular (Figura 39) [247, 262]. Para temperaturas superiores a 43 $^\circ\text{C}$ não se verifica este efeito, uma vez que ocorre a inibição imediata da termotolerância, no entanto, o regresso à temperatura normal de 37 $^\circ\text{C}$ é acompanhada por este fenómeno que tem um máximo às 8-10h com decaimento até 60-100h [247].

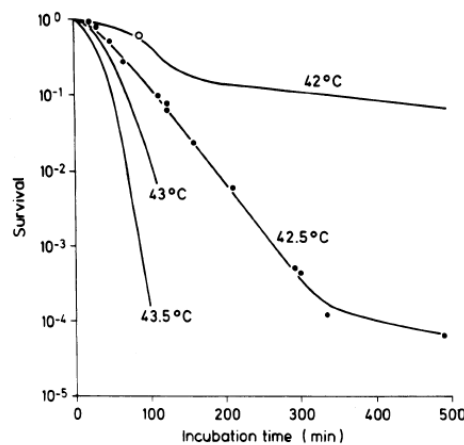


Figura 39 – Relação dose-efeito da morte celular por hipertermia. Desenho esquemático da fracção de sobrevivência de células assíncronas de ovário de hamster aquecidas a diferentes temperaturas, com ênfase no “ombro” típico aos 42 $^\circ\text{C}$. Adaptado de Hildebrandt, 2002 [262].

O cálculo da dose térmica em hipertermia integra o conceito de dose de isoefeito térmico (DIT), muito útil para comparar diversos estudos. A DIT foi introduzida para converter uma dada dose térmica nos chamados minutos equivalentes a 43 $^\circ\text{C}$ (*equivalente minutes at 43 $^\circ\text{C}$, EM43*) [262]. Em termos mais simples, o isoefeito converte dados de tempo e temperatura em efeito terapêutico, expresso em percentagem de células tumorais eliminadas [240]. No entanto, a DIT é influenciada pela distribuição da temperatura, pela

termotolerância, pH intracelular e muitos outros factores [262]. Uma definição de dose térmica (D) derivada do tempo de exposição (t) a uma dada temperatura (T) é $D=tR^{t-43}$ com R=2 para temperaturas $\geq 43^{\circ}\text{C}$ e R=4 para temperaturas $< 43^{\circ}\text{C}$, ou em caso de variação de T, é a soma das doses fraccionadas e da sua duração (t+T) [262]. Este cálculo permite aferir o tempo com a temperatura, se houver uma diminuição de 1°C em valores acima de $42,5^{\circ}\text{C}$, o tempo de exposição tem de duplicar, se esse arrefecimento ocorrer em temperaturas inferiores a $42,5^{\circ}\text{C}$ o tempo de exposição tem de quadruplicar [244]. A dose de energia térmica necessária para induzir a morte exponencial das células está correlacionada com a dose necessária para a desnaturação proteica e quantifica-se em 140Kcal/mol, tanto *in vitro* como *in vivo* [155, 262].

A citotoxicidade e a alteração da oxigenação são mecanismos anti-tumorais em hipertermia, contudo são uma função da relação entre o tempo e a temperatura. Por exemplo, em temperaturas mais elevadas há maior probabilidade de indução de citotoxicidade directa, com efeitos deletérios sobre a vasculatura tumoral e consequente hipóxia, que por sua vez gera radioresistência e favorecimento de fenótipos mais agressivos [254]. Por outro lado, temperaturas mais baixas aumentam a perfusão sanguínea e oxigenação, com maior concentração local de fármacos quimioterápicos e maior radiosensibilização, tendo no entanto menor efeito citotóxico. Está ainda por esclarecer qual destas estratégias é mais vantajosa, do mesmo modo que não está estabelecida a optimização da relação temperatura/tempo de exposição e número de tratamentos hipertérmicos em oncologia humana [254]. Neste aspecto, a aplicação da termoterapia em neoplasias espontâneas de animais de companhia pode servir de estudo para uma possível transposição o que reforça o conceito da globalidade em medicina [254].

Em todo o processo a monitorização terapêutica é fundamental para se atingirem os efeitos celulares desejados. A dificuldade central na monitorização é conhecer quanta energia é absorvida e onde é depositada [308]. A taxa de absorção específica (*specific absorption rate, SAR*) define-se como a quantidade de energia absorvida num tecido, em determinada localização, por unidade de massa, expressa em W/Kg. A SAR é determinada, não apenas pela incidência das ondas electromagnéticas, mas também pelas características geométricas e eléctricas do tecido irradiado. Está relacionada com a força do campo eléctrico interno e também com a condutividade e densidade dos tecidos, contudo os tumores estão longe de ser homogéneos bem como os seus limites [308]. A distribuição de SAR é determinada por medição em modelos humanos, em tecidos animais ou por cálculos, sendo estes métodos de extrema importância [242, 308]. No caso das nanopartículas ferrimagnéticas, o valor de SAR pode ser aumentado através de um revestimento com MgO que, para além de ser biocompatível e ter maior magnetização, também estabiliza quimicamente a molécula férrica [306, 309].

Uma limitação crítica na comparação entre os estudos em hipertermia prende-se com a monitorização da temperatura no tecido alvo de modo a assegurar que a temperatura ideal é atingida sem ser ultrapassada [155, 238, 255, 256, 308]. As linhas de orientação actuais prevêm a termometria invasiva através de pequenas agulhas ou tubos inseridos em minúsculos termómetros [256, 308] para além da termometria não-invasiva como termometria por infravermelhos, sensores de fibra óptica, tomografia computadorizada e imagem térmica por ressonância magnética [308, 310].

Os problemas associados à termoterapia são os seguintes: (1) o foco da energia não é necessariamente o foco térmico, uma vez que se dissipa pelos tecidos envolventes até ao equilíbrio térmico, (2) a temperatura e a energia térmica não têm uma correlação simples porque um volume aquecido não tem uma condutividade térmica homogénea dada a tortuosidade e imprevisibilidade da neovascularura tumoral e (3) a elevação térmica aumenta o afluxo local de sangue com maior fornecimento de nutrientes às células neoplásicas e risco mais elevado de invasão, disseminação e metastização (Figura 40) [238].

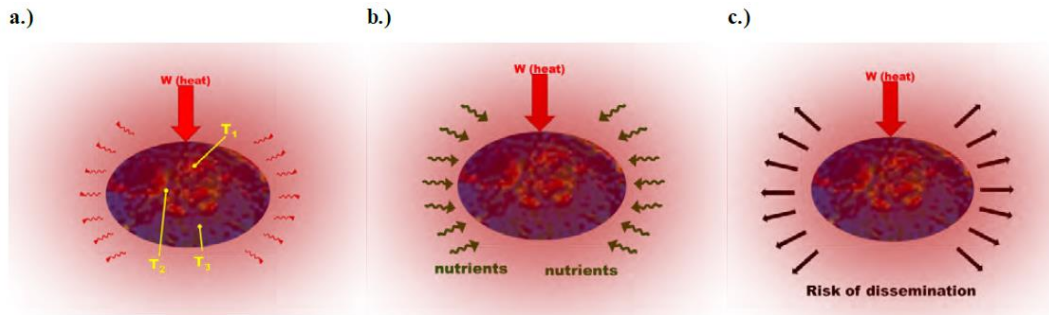


Figura 40 – Desvantagens da hipertermia clássica. a.) A disseminação do calor ocorre no foco da deposição de energia. b.) O aumento do afluxo local de sangue aumenta a disponibilidade de nutrientes ao tumor. c.) Há um aumento do risco de disseminação de metastização. Adaptado de Szasz, 2014 [238].

Os desafios futuros prendem-se com a normalização da dose térmica e a segurança das tecnologias de indução e de termometria, só então a hipertermia usada de modo singular poderá ser considerada em testes clínicos de fase III [155]. O desenvolvimento da termoterapia em oncologia, em particular em combinação com as terapêuticas convencionais, é um bom exemplo de como a engenharia biomédica pode contribuir para o desenvolvimento de modalidades que aumentem a eficácia dos tratamentos [155]. A oncotermia é uma variação muito promissora da hipertermia já que usa as diferenças existentes entre as células neoplásicas e as não-neoplásicas relativamente à constante dielétrica da água associada à membrana celular e aos electrólitos extracelulares sem as desvantagens da hipertermia clássica [238, 311].

Outra variação à hipertermia convencional é quimioterapia hipertérmica fotodinâmica que se descreve abreviadamente como a introdução intratumoral de um químico fotodinâmico capaz de gerar calor quando irradiado por um feixe de luz com o comprimento de onda apropriado [312].

Todas as formas de tratamento hipertérmico requerem mais investigação no sentido de elucidar mecanismos de acção potencialmente benéficos no contexto oncológico. Uma compreensão mais profunda dos processos celulares alterados e com relevância terapêutica facilita a predisposição para a aceitação pela comunidade médica e científica [155].

A vitamina D em terapia oncológica e na diferenciação osteoblástica em células neoplásicas da glândula mamária

A vitamina D é uma hormona esteróide sintetizada na pele humana a partir do 7-deidrocolesterol (pró-vitamina D₃) que, na presença de luz solar e pelos raios UVB (λ de 280-315 nm), é convertida na pele em 7-dehidrocalciferol, também conhecida como pré-vitamina D₃ ou colecalciferol [22, 313-316]. No fígado ocorre uma primeira hidroxilação no carbono 25, que forma a 25-hidroxicoalciferol (calcidiol, 25,(OH)D ou 25D), um metabolito circulante, na ordem dos nmol/L, que está relacionado com o nível de calcitriol [317]. Nas mitocôndrias dos túbulos proximais do rim, ocorre uma segunda hidroxilação na posição 1 α , pela α -1-hidroxilase (CYP27B1) com formação de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃, também denominado de calcitriol, 1,25(OH)₂D ou 1,25D₃, sendo este o metabolito mais activo desta hormona (Figura 41), que é mantido na ordem dos pmol/L por mecanismos de retrocontrolo negativo [314, 318, 319, 323]. A 1,25D₃ forma-se no rim na presença de paratormona (PTH) produzida e secretada pela paratiróide na sequência de hipocalcémia [314]. Por oposição, em estados de normo ou hipercalcémia, e portanto com diminuição acentuada de PTH circulante, a segunda hidroxilação renal ocorre na posição 24 pela enzima 24-hidroxilase (CYP24A1), um metabolito menos activo que pode ser convertido em ácido calcitrico e excretado [315, 316]. No entanto há evidência de que o 24,25(OH)D tem um papel importante na diferenciação osteogénica e na homeostasia óssea [320, 321].

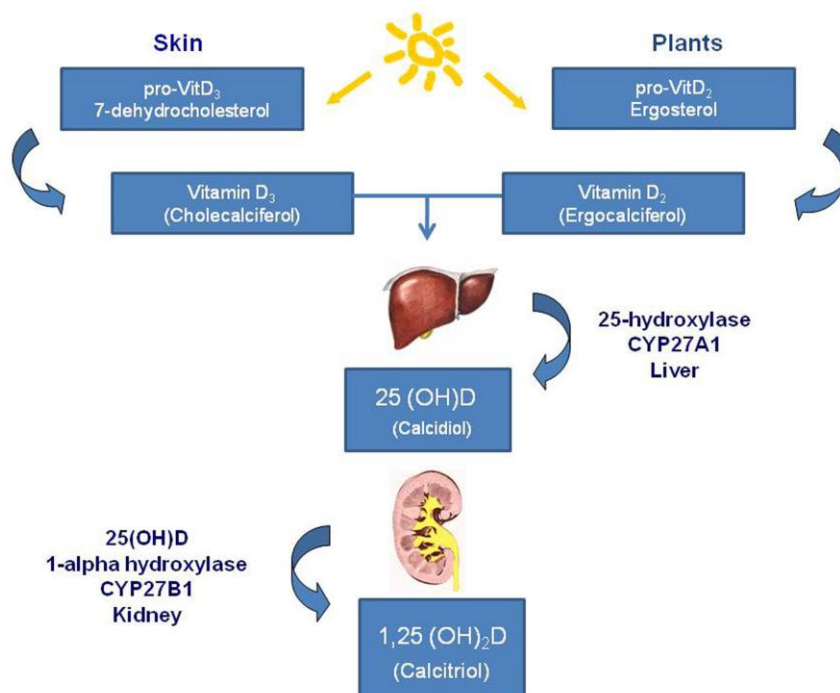


Figura 41 – Síntese da vitamina D em pele, de humanos e de animais, quando exposta a raios ultravioleta B. Nestas condições, o colecalciferol é sintetizado a partir de 7-deidrocolesterol. A síntese envolve as hidroxilações 25 e 1 α da vitamina D₂ e D₃, no fígado e no rim, respectivamente, formando a 1,25(OH)₂D ou calcitriol. Adaptado de Vuolo, 2012 [313].

Em tecidos extra-renais, a síntese autócrina de calcitriol não é sensível à calcémia, dependendo apenas da disponibilidade de 25(OH)D que se relaciona directamente com a disponibilidade de colecalciferol ou de calcidiol [322]. A suplementação oral com vitamina D₃ é muito ineficaz já que cerca de 75% não chega a ser convertido em calcitriol [322]. Quando em excesso, é armazenado no tecido adiposo, ósseo e em alguns órgãos, na forma de calcidiol, o que permite manter o seu equilíbrio sérico [314, 321, 322]. A dose de suplementação segura, não-tóxica, de colecalciferol está mal estabelecida e o melhor método para a monitorizar passa pela avaliação do ratio cálcio/creatinina na urina, devendo ser mantido em valores inferiores à unidade [322].

O calcitriol é uma hormona considerada essencial para o desenvolvimento e manutenção de ossos saudáveis já que participa na homeostasia dos iões cálcio e fosfato, ao promover a absorção intestinal de cálcio e a sua recaptação nos túbulos renais, ao mesmo tempo que favorece a excreção renal de fosfato [315, 318, 323]. As duas fontes naturais de vitamina D são o colecalciferol presente em óleo de peixe e ovos e o ergocalciferol presente em algumas plantas [314, 315, 319]. A farmacocinética desta vitamina e dos seus principais metabolitos estão detalhadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Características farmacocinéticas da vitamina D e dos seus principais metabolitos. Adaptado de Vieth, 2011 [322].

	Vitamina D ₃ (colecalciferol)	Vitamina D ₂ (ergocalciferol)	25-Hidroxivitamina D ₃	1,25-Dihidroxivitamina D ₃
Volume de distribuição	Maior do que o volume corporal	Maior do que o volume corporal	Maior do que o volume plasmático	Compartimento plasmático
Distribuição tecidual por tempo alargado	Tecido adiposo e músculos	Tecido adiposo e músculos	Sangue, tecido adiposo e músculo	Sangue e tecidos
Semi-vida em circulação	2 dias	2 dias	2 semanas	12 horas
Semi-vida funcional	2-3 meses	Igual ou inferior a 2 meses	2 a 3 meses, se gerada a partir de vitamina D ₃ armazenada	12 horas
Dose diária fisiológica	5-250 µg/dia	N/A	5-60 µg/dia	1-2 µg/dia
Dose diária farmacológica	>250 µg/dia	>250 µg/dia	>60 µg/dia	>2 µg/dia
Dose mínima diária com toxicidade	>1000 µg/dia	>1000 µg/dia	Não testado, provavelmente 400µg/dia	>2 µg/dia

1µg = 40IU de vitamina D₃ ou de vitamina D₂. As doses dos restantes metabolitos são consideradas em unidades de massa.

A vitamina D e os seus análogos activam vias genómicas e vias não genómicas com implicação fisiológica [317, 321]. A resposta genómica clássica é mediada pelo receptor da vitamina D (*vitamin D receptor*, VDR), um membro da superfamília dos receptores nucleares de hormonas esteróides, presente em mais de 30 tecidos, incluindo intestino, rim, osso, cérebro, estômago, coração, pâncreas, pele, linfócitos B e T activados, cólon, ovário, glândula mamária e próstata [315, 316, 318]. O VDR é um factor de transcrição activado por ligando que, em combinação com o receptor retinóide X (RXR) e em alguns casos com o receptor retinóide A (RAR) liga-se ao elemento responsivo ao receptor da vitamina D (*vitamin D receptor response elements*, VDRE) na promoção de mais de 200 genes alvo relacionados, por exemplo, com o crescimento celular, apoptose, diferenciação osteoblástica a partir de células estaminais do mesênquima (*Mesenchymal stem cells*, MSCs), inflamação e sistema imunitário (Figura 42) [317-319, 323, 324]. A grande afinidade do heterodímero receptor VDR/RXR interage com complexos de co-ativação que ligam o VDR ao complexo RNA-polimerase e a transcrição tem início [317]. Alguns genes são conhecidos por terem VDRE funcionais. Dentre estes, alguns estão relacionados com a formação de osso, como os genes que codificam para a fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*, ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OSC), sialoproteína óssea, proteínas de ligação do cálcio (calbindina-D28k e D9k), frutose 1,6-bisfosfato, PTH, proteína relacionada com a PTH, hormona de crescimento e receptor de activação do ligando NF- κ B [318, 323] e ainda outros genes, como o p21, que são reguladores do ciclo celular [317, 318]. Podem ainda enumerar-se o receptor de insulina, 15(OH)D₃ 24-hydroxilase, GADD45, TNF- α , CYP3A4, uPA, proteína lipase C γ (PLC γ), TGF β 2, fibronectina, integrina β 3 e involucrina [317, 318].

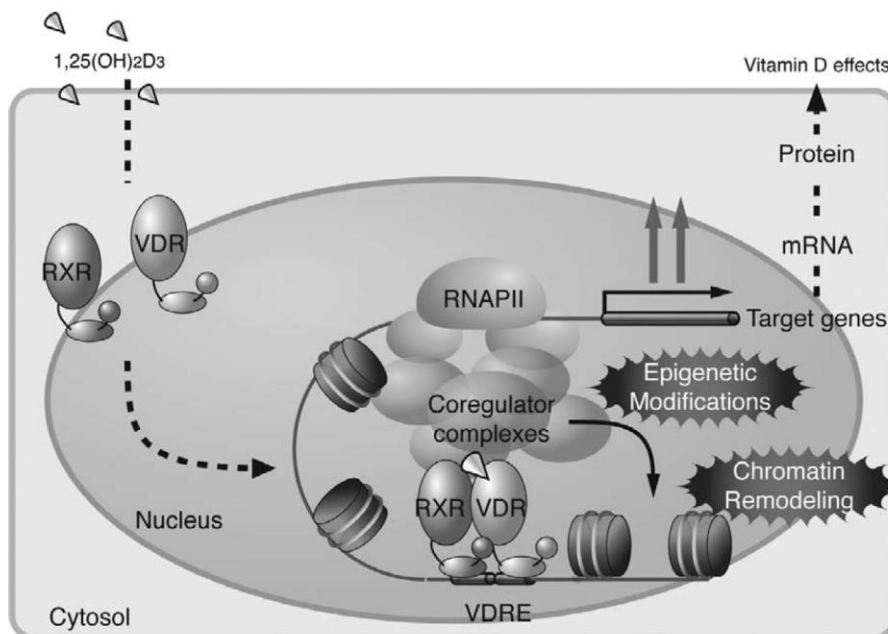


Figura 42 – Esquematização dos mecanismos moleculares de acção do calcitriol. A activação do receptor da vitamina D (*vitamin D receptor*, VDR), localizado no núcleo, ocorre por ligação com 1,25D₃ formando um heterodímero com o receptor retinóide X. O dímero VDR/RXR associa-se ao elemento responsivo ao receptor da vitamina D, (*Vitamin D receptor response element*, VDRE) e recruta vários complexos co-reguladores no promotor do gene alvo. Dão-se então alterações epigenéticas e remodelação da cromatina que resultam na activação da expressão génica. Adaptado de Kouzmenko, 2011 [325].

Além dos efeitos genómicos do VDR, a vitamina D regula vias de sinalização no citoplasma através da proteína cinase C, proteína cinase RAS activada por mitogénio (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK), proteína lipase A e prostaglandinas, AMP cíclico e proteína cinase A, Pi3k, via ceramida e canais de cálcio sensíveis a voltagem ou canais de cálcio insensíveis a voltagem (Figura 43) [326]. A activação das vias de sinalização resulta, com frequência, em alterações dramáticas na concentração do cálcio intracelular e na activação ou desactivação de inúmeras proteínas como bcl-2 e c-jun. Algumas destas vias alteram o crescimento celular, diferenciação e apoptose e podem cooperar com a via genómica clássica com trans-activação do VDR (Figura 43) [313, 317, 318].

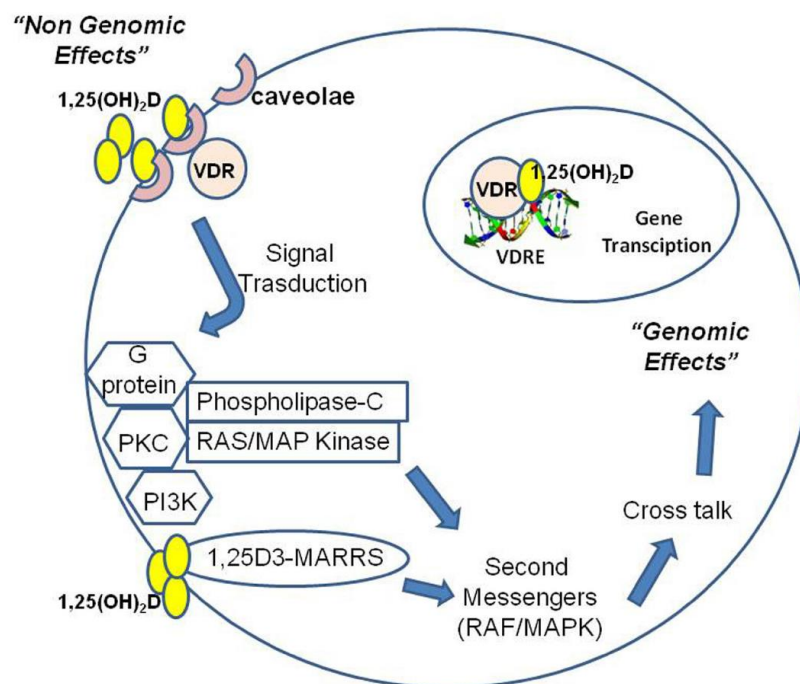


Figura 43 – A 1,25(OH)₂D tem efeitos fisiológicos pela via genómica, mediada pelo receptor nuclear e pela via não-genómica, através de mecanismos iniciados na membrana plasmática. A 1,25(OH)₂ interage com o receptor da vitamina D (*vitamin D receptor*, VDR) localizado no núcleo onde desencadeia efeitos genómicos ou, por outro lado, na caveola da membrana plasmática onde desencadeia respostas rápidas não-genómicas. A 1,25(OH)₂D interage directamente com o ligando esteróide de respostas rápidas associado a membranas (*membrane-associated, rapid response steroid-binding*, MARRS) com activação de segundos mensageiros, incluindo a fosfolipase C, a proteína cinase C (PKC), receptores ligados à proteína G ou a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). Os resultados possíveis desta via membranar incluem a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem ou canais de cloro ou geração de segundos mensageiros. Alguns destes segundos mensageiros, em particular RAF/MAPK, por trans-activação do VDR, podem regular da expressão génica. Adaptado de Vuolo, 2012 [313].

A intensidade de exposição aos UVB diminui com o aumento da latitude e verifica-se, em muitos estudos epidemiológicos alusivos a cancro de mama, colorectal e prostático, que a população menos exposta à luz solar tem maior incidência de neoplasias não cutâneas em comparação com a população que vive em latitudes mais baixas [22, 314, 319]. Estas observações conduziram à reflexão de que a vitamina D poderia ter um papel protector do desenvolvimento tumoral [22, 314, 315, 327], apesar de inconsistências encontradas em estudos epidemiológicos que relacionam a quantidade de vitamina D proveniente da dieta com os tumores agressivos de mama [316, 317]. Em humanos, os resultados destes estudos são mistos e o benefício da vitamina D é difícil de demonstrar. Pelo contrário, os estudos em animais são muito consistentes na demonstração do carácter preventivo do calcitriol numa variedade de tumores [22] como os de mama [328].

Em humanos e animais o desenvolvimento da glândula mamária, depende da expressão de VDR para o seu apropriado desenvolvimento durante a puberdade, gestação e involução, sendo regulada de forma dinâmica ao longo do ciclo reprodutivo [315, 316]. Os VDRs, bem como as enzimas envolvidas na síntese, CYP27B1, e na degradação, CYP24A1, da $1,25D_3$, foram identificados, não só em muitos tecidos periféricos não-neoplásicos [318], mas também em células neoplásicas da glândula mamária, [319], com possível correlação entre a agressividade tumoral e a quantidade de CYP24A1 e de CYP27B1 (Figura 44) [315, 316]. Estas células podem assim converter a $1,25D_3$ nos metabolitos menos activos, 24,25-dihidroxitamina D_3 e 1,24,25-trihidroxitamina D_3 , completando o eixo que coordena localmente e síntese e a degradação do calcitriol e a sua transdução de sinal, via VDR [319]. Um outro aspecto relevante é o polimorfismo deste receptor em indivíduos saudáveis e em carcinomas mamários que pode explicar algumas inconsistências entre os estudos relacionados com os efeitos oncológicos da vitamina D [313-315].

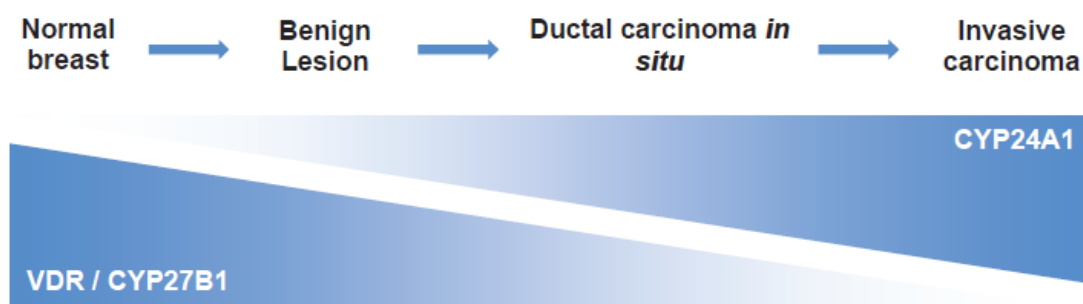


Figura 44 – A expressão de VDR e de CYP27B1 diminui com a carcinogénese mamária, enquanto a expressão de CYP24A1 aumenta com os fenótipos mais invasivos. Adaptado de Lopes, 2012 [316].

Em modelos experimentais pré-clínicos, o calcitriol, tem actividade antineoplásica significativa, incluindo tumores de mama, próstata, cólon, pele e cérebro, células de leucemia mieloide e outras [313, 317, 318, 329]. Os mecanismos de actividade propostos incluem inibição da proliferação associada a paragem do ciclo celular e, em alguns modelos, diferenciação, diminuição da invasividade, da metastização e da angiogénese e indução de apoptose (Figura 45) [314-319]. O calcitriol induz paragem do ciclo celular na transição de Go-G1, por estimular a expressão de inibidores de CDK como o p21 e p27, por diminuir a expressão de oncogenes como o *c-Myc* e *c-Fos* bem como a acção de diversos factores de crescimento como

EGF, TGF e IGF-1 [316, 319, 330]. Mais ainda, esta vitamina regula a família de genes *Bcl-2* levando a que uma baixa expressão de proteínas anti-apoptóticas, comparativamente a proteínas pró-apoptóticas como a *Bax* e *Bak* [319]. Também a E-caderina é mais expressa em alguns estudos *in vitro* em meios enriquecidos com calcitriol, enquanto a P-caderina é diminuída e verifica-se ainda uma diminuição da actividade de MMP-9 e uPA e um aumento da expressão do inibidor do plasminogénio e do inibidor das MMP-1, o que em conjunto previne a invasão e metastização [316, 319, 331]. Estes efeitos antineoplásicos não são bem entendidos, mas pensa-se que estejam relacionados com a indução da diferenciação celular em células cancerosas [331]. Em ratos com tumores de mama induzidos por DMBA há referência de que a suplementação de cálcio e vitamina D na dieta tem efeitos negativos sobre a incidência carcinogénica, no entanto não há dados quanto aos efeitos terapêuticos do colecalciferol em tumores de mama já formados [328, 329].

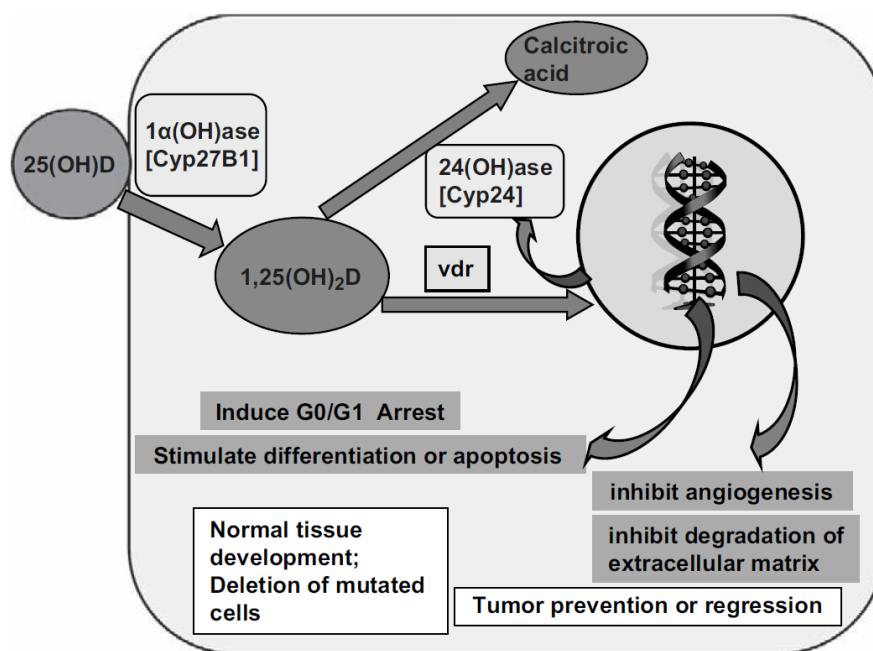


Figura 45 – Esquematização dos efeitos potenciais da vitamina D no desenvolvimento e progressão de carcinomas. A 25(OH)D circulante pode ser um substrato para a produção local de 1,25(OH)₂D pela CYP27B1 em múltiplos tipos celulares. Esta forma activa de vitamina D modifica a transcrição de genes, pela ligação com o VDR. A enzima CYP24 é induzida pelo VDR e metaboliza a 1,25(OH)₂D em ácido calcitrico com limitação da concentração da vitamina D activa na célula. A activação do VDR pode alterar genes que contribuem para a paragem do ciclo celular, estimulação da diferenciação, inibição da apoptose, inibição da angiogénese e inibição da degradação da matriz. Adaptado de Hendy, 2011 [332].

Na presença de 1,25D₃ há ainda efeitos anti-inflamatórios por diminuição da expressão da ciclooxigenase-2 com aumento da degradação de prostaglandinas implicadas na proliferação celular e resistência à apoptose, invasão e angiogénese, o que contraria estes efeitos [319]. Apesar da interacção entre vitamina D, inflamação e cancro não ser clara, o facto do VDR ser expresso em células do sistema imunitário emerge a possibilidade da vitamina D poder ter actividade imunomoduladora. As células onde se reconhece essa influência são monócitos, macrófagos, APCs e LT CD4 [313]. O calcitriol inibe a proliferação de LT e altera a expressão de citocinas do perfil Th1 para Th2 e ainda modula a actividade das células dendríticas. Apesar desta hormona não ter actividade antimicrobiana, aumenta a actividade macrofágica, por exemplo, contra o

Micobacterium tuberculosis [313]. Também a actividade do estrogénio se torna limitada na presença de quantidade adequada de vitamina D₃ activa, quer por diminuição da expressão da aromatase envolvida na sua síntese, quer por diminuição do receptor de estrogénio [316, 319].

No entanto, há uma grande variabilidade dos efeitos patofisiológicos da vitamina D em neoplasias, uma vez que dentre os diferentes fenótipos podem desenvolver-se mecanismos de resistência aos efeitos antineoplásicos mediados pelo calcitriol. Por exemplo, por perda de expressão do VDR, alteração do metabolismo intracelular por diminuição da sua síntese, devido à diminuição da CYP27B1, e aumento do catabolismo, por aumento da CYP24, e ainda por diminuição da sinalização via VDR [333].

O efeito antineoplásico da vitamina D requer concentrações supra-fisiológicas significativas na ordem dos nmol/L, que não podem ser alcançadas em tomas diárias devido à ocorrência previsível de hipercalcémia e hipercalcúria [315, 318, 324]. A administração intermitente permite um aumento gradual da dose até um pico potencialmente terapêutico, que tem sido usado em ensaios clínicos de fase II em associação com antineoplásicos em doentes com cancro de próstata [318]. Outra estratégia passa pela administração conjunta com glucocorticóides, como a dexametasona, já que este fármaco inibe a absorção intestinal de cálcio e aumenta a sua excreção renal, opondo-se por isso aos efeitos do calcitriol [324, 331]. Os glucocorticóides aumentam ainda os níveis de VDR e assim os efeitos antiproliferativo e indutor de diferenciação celular pela vitamina D [324]. Quando administrados em conjunto, os corticosteróides não influenciam os níveis de conversão de colecalciferol em calcidiol ou em calcitriol [334]. No entanto, a dexametasona é sinérgica com a vitamina D na indução de diferenciação numa linha celular de leucemia mielóide de murinos e há evidência, mais *in vitro* do que *in vivo*, de que administradas em conjunto aumentam os efeitos da vitamina D quanto à inibição de crescimento, paragem do ciclo celular e apoptose em carcinomas de células escamosas, possivelmente pela influência positiva da dexametasona sobre a expressão do VDR [331]. Quanto à influência da dexametasona na diferenciação celular, os seus efeitos são específicos de espécie. Em humanos aumenta a mineralização enquanto em ratinhos se verifica o oposto [335, 336]. Nas fases mais iniciais de diferenciação celular a dexametasona tem um efeito comprovado, sem, no entanto, lhe serem reconhecidas funções no direccionamento dessa diferenciação [335, 337]. Por isso o momento de administração deste glucocorticóide influencia muito o processo de diferenciação a partir de células estaminais da medula óssea [335]. Os análogos da vitamina D estudados são promissores quanto aos efeitos anticancerígenos, mas não totalmente satisfatórios uma vez que, de alguma forma, são ainda hipercalcemiantes [314].

As proteínas morfogénicas do osso têm um envolvimento fisiológico no processo de ossificação e, como já descrito, um envolvimento na transição epitélio-mesenquimatosa. Não obstante ao seu amplo envolvimento em múltiplas neoplasias e nos processos de invasão e metastização [338], as BMPs e a expressão e activação de VDR influenciam directamente a diferenciação de osteoblastos a partir de MSCs e o seu crescimento [144, 323, 337]. A mineralização de tecidos ósseos, cartilagíneos e extra-esqueléticos ocorre sob influência da vitamina D e das BMPs, que pertencem à superfamília TGF- β [323, 335, 337]. O VDR está presente nos osteoblastos e a sua expressão é regulada pela 1,25D₃ e por outros factores como a PTH, glucocorticóides, TGF- β e EGF [323]. A mineralização óssea requer múltiplas células, como MSCs, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Durante a diferenciação osteoblástica, várias fases funcionais podem ser identificadas: proliferação, produção, maturação e mineralização da ECM [323]. Os osteoblastos sintetizam a proteína mais abundante no osso, o colagénio tipo I e uma grande quantidade de proteínas não-colagénicas, até que ficam aprisionados na ECM mineralizada tornando-se osteócitos [323]. No período de pré-mineralização, a 1,25D₃ influencia a composição proteica da ECM por induzir a produção de ALP, BMPs, sinalização Wnt, entre outros factores [323]. Em rato e humanos, a vitamina D₃ aumenta a mineralização dos osteoblastos, por intermédio do VDR, ao contrário do que ocorre em murganhos onde se verifica a inibição da mineralização sob a mesma influência [323]. Pensa-se que esta discrepância se relacione com a quantidade de ALP extracelular [323], crítica na diferenciação osteoblástica e mineralização [335]. Para além de estimular a mineralização, a vitamina D₃ regula alguns mecanismos protectores da calcificação excessiva através do aumento da expressão de inibidores [323], para além de induzir a expressão de *CYP24A1*, que degrada a forma 1,25(OH)₂D₃ para o metabolito 24,25(OH)₂D₃ [323]. Em estudos com células estaminais do tecido adiposo, a BMP-2, o calcitriol e a dexametasona foram bem-sucedidos na indução de diferenciação osteoblástica [335, 337]. Os marcadores desta diferenciação são a osteopontina, osteocalcina, osteonectina e fosfatase alcalina [330, 339].

Uma vez que durante a carcinogénese as células transformadas detêm, ou re-adquirem, fenótipos tipo-estaminal podem passar pelo programa EMT e adquirir vimentina e β -catenina nuclear, que são características de um fenótipo osteoblástico capaz de formar mineralização (Figura 46) [340]. A disponibilidade de iões cálcio e fósforo provém da hidrólise do ATP em ADP e AMP que liberta fosfato inorgânico disponível para integrar os cristais de hidroxiapatite (HA). Também a acção da fosfatase alcalina sobre os polifosfatos da matriz liberta cálcio e fosfato para a mineralização [336]. As microcalcificações surgem precocemente nas neoplasias malignas da glândula mamária e são elementos muito importantes no diagnóstico por mamografia [336, 340, 341]. As suas características físicas e químicas permitem que sejam agrupadas em calcificação do tipo I, encontrada sobretudo em tumores benignos, sendo compostas por oxalato de cálcio (CO) de cor âmbar parcialmente transparente, forma piramidal e superfícies relativamente planares; calcificações do tipo II, identificadas em tumores benignos e malignos, sendo compostas por fosfato de cálcio, sobretudo HA, acinzentadas, opacas, fusiformes ou ovóides e com superfícies irregulares [336, 340]. Considerava-se que estas mineralizações se deviam a degenerescências celulares, mas recentemente foi sugerido que a mineralização ectópica em condições patológicas pode ter os mesmos mecanismos de regulação que existem nas condições fisiológicas, ou seja: iniciação mineral mediada por vesículas na matriz, nucleação de cristais minerais e mineralização ectópica [336, 340, 341]. As vesículas da matriz são estruturas de 100nm de diâmetro, associadas

à membrana celular de condrócitos, osteoblastos e odontoblastos. Há evidência de que a mineralização se inicia nestas vesículas, progredindo depois para o interstício extravascular e para as fibras de colagénio adjacentes [336]. No citoplasma, também há vesículas associadas à membrana de células neoplásicas da mama com mineralização por HA, sendo mais uma contribuição para as microcalcificações.

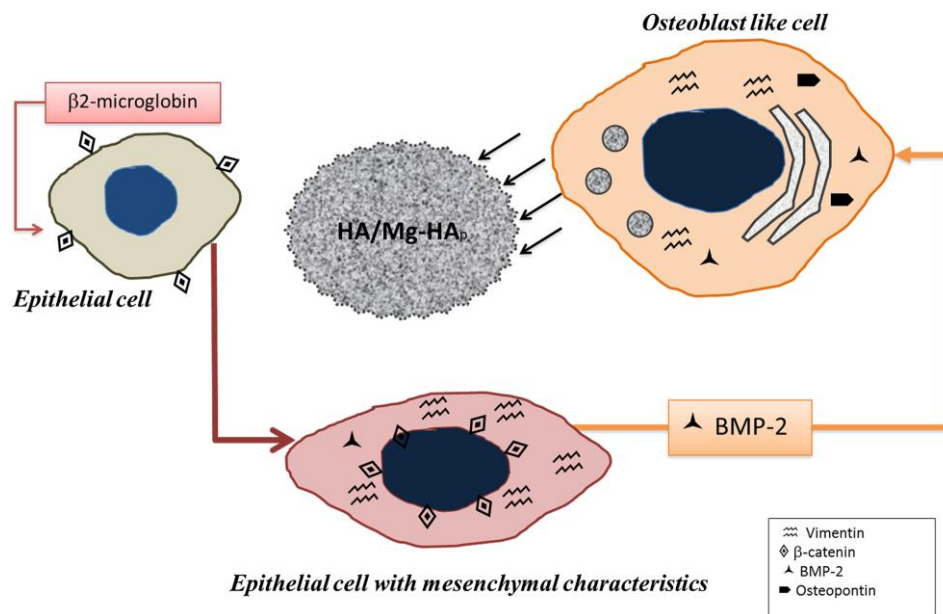


Figura 46 – Modelo de transformação mesenquimatosa e deposição de cálcio em tumores de mama. A mineralização fisiológica envolve células mesenquimatosas que expressam vimentina e β-catenina nuclear/citoplasmática. Num ambiente condicionado por β-2 microglobulina as células epiteliais adquirem um fenótipo com características mesenquimatosas, podendo assumir um fenótipo osteoblástico com produção de formas complexas de calcificação. Adaptado de Scimeca, 2014 [340]

A propagação da mineralização em proteínas não-colagénicas da matriz extracelular estão directamente implicadas na nucleação, como fosfoproteínas, fosfolípidos e proteolípidos. A ligação de fosfoproteínas ao colagénio é necessária para que a mineralização se inicie [336]. Os cristais de HA, uma vez nucleados, proliferam com deposição de cristais num processo regulado que pode ser aumentado ou inibido através de proteínas da matriz óssea como as proteínas não-colagénicas osteopontina, sialoproteína óssea e fosfatase alcalina. A importância fisiológica destas proteínas na mineralização e o seu envolvimento potencial nas neoplasias malignas da glândula mamária e na sua mineralização está sumariada na Tabela 12 [336].

Tabela 12 – Sumário dos mediadores da mineralização óssea e a sua associação com tumores de mama. Adaptado de Cox, 2013 e Donnelly, 2011 [336, 342].

Proteínas da matriz óssea	Actividade na mineralização fisiológica	Implicação nas neoplasias malignas da glândula mamária
Colagénio Tipo-1	Forma uma rede de fibras na ECM para a deposição de cristais de HA	- A degradação de colagénio na ECM tumoral é evidente. Fibras de colagénio longas e rectas estão associadas com neoplasias malignas - Há elevação sérica de peptídeos de colagénio em doentes com cancro de mama metastisados no osso
Osteopontina (OPN)	- Na forma fosforilada é um regulador negativo da mineralização - Liga-se à HA e previne a deposição adicional de cristais	- Um aumento da expressão de OPN em tumores de mama humanos e no plasma está associado a pior prognóstico. A sua expressão está ainda associada a microcalcificação mamária
Sialoproteína óssea	- Expressão aumentada em locais de formação óssea - Funciona como um nucleador de HA. - Pode mediar a ligação de osteoblastos à matriz óssea	- Sobreexpressão em lesões malignas da mama, em tumores com microcalcificação e está associada a menor sobrevida
Proteína da matriz da dentina-1	- Promove a mineralização - Liga-se a fibrilhas de colagénio - É um nucleador de HA na presença de colagénio tipo 1	- Níveis elevados em tumores de mama estão associados a risco diminuído de desenvolvimento de metástases ósseas e tem associação com maior sobrevida - Inibe a motilidade das células tumorais
Sialofosfoproteína da dentina	- A sua clivagem produz dentina fosfoproteica que se liga ao colagénio tipo 1. - Na fase inicial da mineralização promove a formação de HA e na fase final inibe ou diminui o crescimento da mineralização	- Em tumores de mama está aumentada
Fosfoglicoproteína da matriz extracelular	- Considerada um regulador negativo da mineralização fisiológica	- Em tumores de mama é minimamente expresso
Fosfatase alcalina	- Aumentada durante a mineralização osteoblástica - Promove a mineralização por hidrólise de fosfato orgânico em inorgânico - Inibe a OPN por desfosforilação - Hidrolisa o pirofosfato orgânico em fosfato inorgânico	- Níveis séricos elevados estão associados a metástases ósseas
Pirofosfato inorgânico	- Inibe a mineralização dos osteoblastos - Inibe a fosfatase alcalina na hidrólise do fosfato orgânico - Aumenta a transcrição de OPN	- A suplementação exógena em linhas celulares de mineralização não surte efeito, devido a provável sobreexpressão de fosfatase alcalina
Fentuina-A	- Um inibidor circulante da mineralização - Forma colóide calciproteico que resulta na diminuição de cálcio no fluido extracelular	- Tem potencialidade de vir a ser um biomarcador de neoplasias malignas, não havendo consenso entre estudos
Proteína gla da matriz	- Inibe a mineralização por formação de um complexo com fentuina-A, cálcio e BMPs que reduz a concentração de cálcio no fluido extracelular	- As células com expressão de RNAm não têm relação com calcificação tumoral - O seu aumento está associado a pior prognóstico
Osteocalcina (OSC)	- Sintetizada pelos osteoblastos e aumentada durante a formação óssea - OSC atrai iões cálcio que podem então ser integrados em cristais de HA	- Níveis séricos estão elevados em doentes com tumores de mama primários e metástases ósseas
Osteonectina (OSN)	- Sintetizada e secretada por osteoblastos e integrada na matriz óssea - Aumenta a capacidade de HA se ligar ao colagénio tipo 1	- Pode ser um biomarcador da progressão tumoral, mas ainda em debate - Expressão aumentada em tumores associados a microcalcificação mamária

A osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína ligada a integrinas extracelulares, produzida por uma variedade de tecidos e tipos celulares, com grande associação cancerosa [232, 343]. O seu nome advém do potencial de conexão entre as células e HA através das suas componentes RGD (elemento arginina-glicina-aspartato) e elementos de ácido poliáspártico [341, 344, 345]. Fisiologicamente é uma molécula com um importante papel durante o processo de mineralização uma vez que no estado fosforilado inibe a formação de

HA e no estado desfosforilado promove a mineralização [336, 340, 345]. A OPN existe enquanto molécula imóvel na ECM de tecidos mineralizados e como citocina em fluidos corporais que contenham a sequência RGD o que que facilita as interações RGD-dependentes com os receptores de integrinas e medeia a ancoragem celular, a migração celular e a sinalização intercelular [344-346]. A regulação da expressão de OPN não está totalmente compreendida, mas o promotor do seu gene pode ligar-se com o VDRE, com o elemento responsivo aos glucocorticóides e com o elemento induzido por interferão [344, 347]. Os mediadores clássicos da inflamação aguda como TNF- α e IL-1 β induzem fortemente a OPN, enquanto outros exercem uma regulação positiva como a angiotensina II, TGF- β , hiperglicémia e hipóxia [344]. Na Tabela 13 estão indicadas as amplas funções e modulações da OPN em condições fisiológicas e patológicas.

Tabela 13 – Efeitos fisiopatológicos desencadeados pela osteopontina (OPN). Adaptado de Mazzali, 2002 [344].

Âmbito da acção fisiopatológica	Células e processos influenciados pela OPN
Biomineralização	Regulação da reabsorção normal do cálcio. Inibição da cristalização urinária e de calcificação cardiovascular.
Função leucocitária	Produção de citocinas macrófágicas.
Quimiotaxia de leucócitos	Macrófagos Linfócitos T
Regulação de NOS	Células epiteliais Macrófagos
Sobrevivência celular	Células epiteliais Células endoteliais Células musculares lisas
Oncobiologia	Invasão tumoral Metastização
Processo de cicatrização	Proliferação celular Fibrose

Em contexto neoplásico, a OPN estimula a motilidade celular, a secreção de uPA e contribui funcionalmente para a agressividade do fenótipo celular e para a progressão tumoral e metastização [232, 336, 343, 344, 346], sendo um marcador tumoral para muitos tumores malignos, como os de mama [232, 343]. Num estudo de diferenciação osteoblástica, a sua expressão foi aumentada pela suplementação com vitamina D₃ com concomitante aumento de osteocalcina [348]. A osteocalcina (OSC) é uma proteína não-colagénica sintetizada por osteoblastos que regula a mineralização durante a formação óssea [336] sendo considerada um marcador tardio da diferenciação osteoblástica [335]. Em geral, sob a influência de dexametasona a sua expressão é diminuída ao contrário do que ocorre sob a influência da vitamina D₃ [335]. A dexametasona entra na célula, liga-se ao receptor glucocorticóide, desloca-se para o núcleo e junta-se ao elemento responsivo aos glucocorticóides, que está presente em genes com marcadores ósseos como a sialoproteína e a OSC [349]. Contudo, estas modulações variam em função do estado de diferenciação osteoblástica. Nas fases iniciais, a dexametasona aumenta a transcrição de OSC, ao passo que em células maduras verifica-se uma diminuição desta proteína [350]. Em doentes com metástases ósseas em fase de tratamento, a osteocalcina parece ser um marcador fisiológico da retoma da actividade osteoblástica [336]. Em suma, os efeitos predominantes da vitamina D sobre os osteoblastos são o aumento da expressão de ALP, osteopontina e osteocalcina e inibição da síntese de colagénio, contudo variam com o estado de diferenciação dos osteoblastos [350].

Os modelos experimentais em investigação oncológica da mama

O murganho ou ratinho doméstico (*Mus musculus*) é um comensal que coabita com a humanidade desde o desenvolvimento da agricultura [351]. Aficionados asiáticos destes animais deram origem a linhas de reprodução que estão na origem do ratinho de laboratório [351]. Os primeiros registos escritos de variedades do ratinho doméstico vêm da China em 1100 a.C. e por essa altura no Egipto surgiram pictogramas de ratinhos coloridos [351, 352]. No final do século XIX, cientistas Europeus estudavam os tumores de mama espontâneos em ratinhos isogénicos para investigação oncológica e oncologia comparativa [2, 351, 352]. Nos anos 30 do século XX estavam já desenvolvidas muitas estirpes isogénicas de murganho que desenvolveram a genética mendeliana e um pouco mais tarde, a descoberta do vírus do tumor mamário de murinos foi um grande avanço para a oncologia molecular [2, 351, 352]. Nos anos 40, os modelos de carcinogénese química davam passos significativos com a caracterização das fases de desencadeamento tumoral [353, 354]. Nos anos 60, os conceitos de iniciação, promoção e progressão da carcinogénese estavam estabelecidos [355] com a publicação de trabalhos inovadores [356]. No final dos anos 80, com a introdução de ratinhos geneticamente modificados na patologia experimental, foi possível desenvolver o estudo das CSCs e testar o efeito carcinogénico de diferentes vias moleculares (Figura 47) [2, 351, 357].

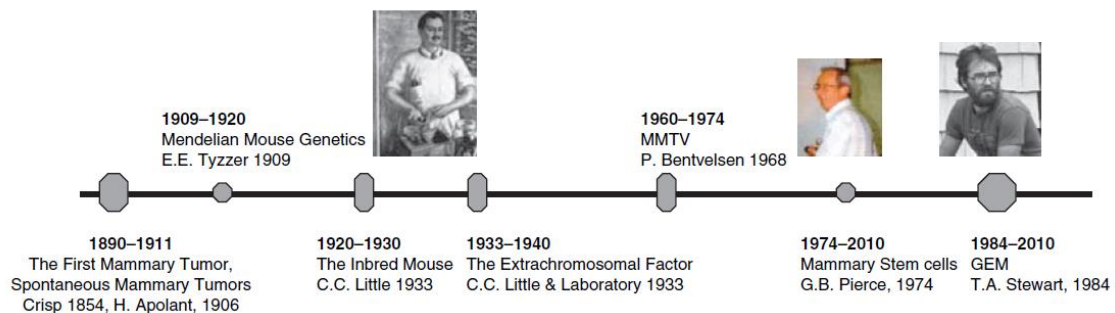


Figura 47 – Evolução histórica da utilização dos murganhos desde o estudo dos tumores espontâneos até aos transgénicos da actualidade. *Genetic engineered mice* (GEM). Adaptado de Cardiff, 2011 [351]

A investigação oncológica com recurso a modelos em animais é rotineira e bem aceite tanto na investigação aplicada como na investigação clínica [5, 138, 358]. A comunidade científica tem feito um esforço na harmonização da nomenclatura e critérios de diagnóstico entre as espécies animais e os humanos onde a caracterização molecular e histopatológica são fundamentais [1].

Os investigadores procuram modelos em animais focados numa via particular e que replique fielmente o processo oncológico da mama em humanos. No entanto, esta é uma doença multifactorial e poligénica com significativa variação morfológica, histopatológica e molecular. Por isso, não pode haver um único modelo para o estudo do cancro de mama humano, mas antes um conjunto de modelos onde cada um é único para determinado subtipo ou para cada característica da doença [359, 360].

A conservação de genes e vias celulares nas diferentes espécies, valida os modelos em murganho e rato no estudo do desenvolvimento da glândula mamária, na diferenciação celular [218] e vias de carcinogénese [1, 359, 360]. A glândula mamária dos roedores de laboratório é um órgão importante na avaliação de xenobióticos potencialmente carcinogénicos, sendo que as lesões proliferativas em animais de laboratório surgem maioritariamente pela exposição a agentes genotóxicos ou infecciosos víricos [1, 138, 360]. Não obstante à diferente composição do estroma mamário entre os murinos e os humanos [361, 362], os tumores induzidos nestes animais têm muitas semelhanças morfológicas e moleculares (Tabela 14) [138, 211, 361, 363-366] que permitem desenvolver e testar novas abordagens na prevenção e tratamento, identificação de marcadores tumorais precoces e compreender a biologia *in vivo* e a genética das fases de iniciação, promoção, progressão e metastização [5, 138, 358, 367].

Tabela 14 – Comparação da oncogénese entre o murganho, o rato e o Homem. Adaptado de Medina, 2000 [366].

Característica	Murganho	Rato	Humanos
Carcinogénio	MMTV, carcinogénese química, radiação	Carcinogénese química, radiação	Radiação
Precursor	AH, DH, DCIS	DH, DCIS	DH, DCIS
Relação	Provada	Provada	Inferida
Dependência hormonal	Rara	Frequente	60%
Metastização	Pulmão	Pulmão	Pulmão, osso, cérebro

AH, Alveolar hyperplasia; DH, Ductal hyperplasia; DCIS, Ductal carcinoma in situ.

Os modelos ideais para o estudo das neoplasias de mama em murinos devem-se aproximar dos seguintes critérios: (1) O modelo deve revelar os passos de multiestadiação, permitir a análise dos fenómenos genéticos e biológicos associados, deve ainda ocorrer numa única célula, a progressão do tumor deve estar associada a alterações específicas de células pertencentes à população pré-maligna, a histologia e patologia do tumor deverão ser semelhantes ao seu equivalente da espécie-alvo em estudo, humana ou animal, as metástases devem ser originárias de um tumor primário e o modelo deve ter propriedades específicas que o tornem apelativo para estudar um dos seguintes fenómenos: angiogénese, apoptose/sobrevivência, potencial de replicação ilimitado, invasão tecidual, a acção do sistema imunitário na imunovigilância ou rejeição tumoral [358]. (2) Quanto à genética, é desejável a ocorrência de múltiplas mutações em genes específicos e alterações cromossómicas com equivalência em tumores humanos ou animais e em uma ou mais vias de sinalização, conhecidas de estarem também envolvidas nos tumores da patologia humana ou animal, como por exemplo no gene *p53*, *Rb*, *Ras*, sinalização de factores de crescimento ou telomerase [358]. Os perfis de expressão génica devem ser transponíveis para os humanos e os tumores e devem mostrar efeitos marcantes na generalidade genética para possibilitar estudos de susceptibilidade [358]. (3) Os modelos tumorais deverão reflectir os carcinogénios indutores, provenientes da exposição ambiental, bem como o efeito de promotores tumorais, dietéticos e hormonais [358]. (4) O modelo deve ser passível de testar novas terapêuticas dirigidas a alvos específicos como químicos, vírus, e produtos imunológicos de modo a ser preditivo dos resultados em ensaios clínicos humanos e animais [358].

Os grandes progressos na engenharia genética permitiram construir modelos animais com alterações genéticas conhecidas e paralelas às pretendidas para aplicação nos mais diversos estudos oncológicos a que se propõem [351, 358, 359]. Estes modelos estão bem caracterizados devido à evolução na tecnologia de caracterização celular e molecular como a citogenética, a genómica e os perfis de expressão génica que possibilitam uma ampla análise com vista a uma escolha informada do modelo animal que melhor replica a doença humana [2, 358, 359]. Apesar da emergência de novos modelos com animais para estudar o cancro humano, importa lembrar que os modelos com mais critérios, dos anteriormente descritos, são os modelos mais antigos e menos sofisticados [358]. Estes modelos reflectem a multiestadiação da exposição ambiental, a indução, a promoção, a multiplicação clonal até lesões pré-malignas e a evolução desde lesões localmente invasivas até à formação de metástases [358]. Dos modelos menos sofisticados poucos têm sido bem caracterizados em termos moleculares e não têm recebido a atenção que lhes é devida na oncologia moderna [358].

Os modelos em murganho para o estudo das neoplasias da mama em humanos podem ser categorizados em três grandes grupos: (a) modelos com xenógrafos, (b) modelos induzidos por químicos, vírus ou radiação ionizante, (c) murganhos geneticamente modificados como transgénicos ou *knochouts* [138, 360, 361]. Outros modelos mais complexos baseiam-se numa combinação de metodologias particulares como transgénicos tratados com ionização ou químicos carcinogénicos que aceleram a transformação celular [360]. Actualmente há centenas de linhas genéticas como modelos para o estudo das neoplasias da mama [2, 5, 361]. Os fenótipos mais comuns apresentam uma mutação na via WNT o que contrasta com a não ocorrência desta mutação na maioria dos carcinomas de mama em humanos [368]. A manipulação genética permite activar ou desactivar, num tempo específico e numa localização específica, vias moleculares envolvidas na oncogénese e descobrir novos alvos terapêuticos [2, 5, 369].

Uma grande vantagem dos modelos em murganho, não possível em outros animais, é a transplantação de células tumorais para a almofada lipídica mamária para determinação do comportamento fisiopatológico tumoral o que permite a contextualização das linhas celulares estudadas *in vivo*, formando um mosaico das células tumorais humanas com células do estroma do murganho [2, 5, 351, 357, 360, 361]. Ainda assim, a estabilidade genética dessas linhas num modelo xenógrafo não é garantida [360]. As limitações destes modelos são a existência da mutação em estudo em todas as células, e não apenas nas células estaminais, a limitação da resposta inflamatória e desmoplásica, o padrão de metastização muito diferente do humano e a não transposição do período de incubação tumoral e de características fisiológicas de resposta imunológica e terapêutica dos murganhos para os humanos e para os animais domésticos [2, 5, 355, 361].

A indução química e hormonal de neoplasias de mama em rato (*Rattus norvegicus*) suprime as desvantagens do modelo anterior e permite o estudo de estratégias de quimioprevenção e de tratamentos inovadores num modelo que replica os tumores de mama espontâneos das mulheres e das fêmeas de espécies de interesse veterinário como o cão e o gato [2].

O rato é considerado ideal para investigação em oncologia e toxicologia da glândula mamária [1, 138, 358]. Os modelos com estes animais têm grande penetração e um número diminuto de tumores o que permite não morrerem prematuramente [358]. Idealmente os tumores devem desenvolver-se com um período de latência pequeno e com um período de progressão que permita uma investigação pertinente no tempo útil de

vida do rato [358]. No entanto, nenhum modelo animal permite reunir e recapitular todos os aspectos correspondentes à clínica humana e veterinária pelo que os modelos usados, em isolado ou em combinação, mimetizam com grande precisão um ou mais aspectos críticos de um determinado cancro em humanos ou animais [358]. Considera-se que a carcinogénese química da glândula mamária do rato mimetiza a doença humana já que é um bom modelo de iniciação tumoral, tem uma susceptibilidade variável com a idade e com a história reprodutiva e é passível de terapia experimental [193]. As estirpes mais comuns em investigação são o F344, Long Evans, Sprague-Dawley (SD), Harlan Sprague-Dawley e Wistar [1, 370-373]. As estirpes albinas de rato têm sido muito usadas para modelos de carcinogénese em estudo toxicológicos com diferentes susceptibilidades, sendo a Fischer (F344) e a Long Evans as menos susceptíveis e a Sprague-Dawley (SD) ou Wistar mais susceptíveis onde a incidência de carcinogénese mamária é de 70% a 90% [1, 211, 371]. Nesta espécie há variantes fisiológicas a ter em conta no que respeita à investigação oncológica, por exemplo, as fêmeas virgens SD e F344 entram na meia-idade pelos 8-14 meses, altura em que a senescência reprodutiva se inicia e aumentam os níveis de secreção de prolactina que contribui para alterações morfológicas da glândula mamária, em oposição à menopausa humana que se caracteriza por uma diminuição de prolactina [1, 138, 191].

Os tumores mamários induzidos em roedores por químicos carcinogénicos têm grande aplicação no estudo da iniciação, promoção e progressão da carcinogénese mamária [372, 374]. A transformação celular desenvolve-se de forma sequencial desde a genotoxicidade não corrigida, de onde surgem mutações, translocações cromossómicas, inactivação de genes reguladores entre outras alterações, ao que se segue a proliferação e progressão autónoma de crescimento com invasão e metastização [138, 193, 374]. Os tumores espontâneos em rato são hormonodependentes e podem ser incrementados pela administração de carcinogénios genotóxicos e modulados por uma série de factores como o estado reprodutivo, o tratamento hormonal, a dieta, idade do animal, dose e frequência de administração de carcinogénio [1, 138, 193, 211, 367, 373, 375]. Em murganho os tumores de mama tendem a ser hormono-independentes [370]. Os dois sistemas experimentais mais usados na tumorigénese mamária são o carcinogénio indirecto DMBA, hidrocarboneto policíclico formador de epóxidos genotóxicos e adutos com o DNA, administrado por via intragástrica em ratos SD e o N-methyl-N-nitrosourea (MNU), carcinogénio alquilante de acção directa sobre o DNA, por metilação dos resíduos de guanina, administrado por via intravenosa ou subcutânea em rato SD ou Fischer 344 [138, 193, 372, 376]. Uma única dose de DMBA entre 20-100 mg/kg induz tumores malignos de mama com latências de 8 a 21 semanas e incidência que chega a 75-100%, se for administrado no período de máxima susceptibilidade entre os 45-60 dias [138, 193, 211, 373, 376-378], no entanto, mais tumores podem surgir noutros órgãos [363]. Em murganho BALB/c, a susceptibilidade é de 60% com um período de latência de 200 dias [377]. Após os 55-60 dias, a carcinogénese química actua em rebentos alveolares mais diferenciados e forma lesões benignas mais tardias do que as malignas, como adenomas, quistos e fibroadenomas [138, 193, 211]. O MNU administrado em dose única de 25-50mg/Kg no pico da susceptibilidade causa tumores com tempos de latência, incidência tumoral e número de tumores por animal, semelhantes ao DMBA [138, 193, 379]. A latência tumoral está inversamente relacionada com a dose de carcinogénio enquanto a incidência tumoral bem como o número de tumores por animal estão relacionados com a idade aquando da indução carcinogénica [138, 193].

A administração de DMBA a fêmeas virgens de rato e murganho entre os 45-60 dias, quando os TEBs são muito numerosos e estão em diferenciação para rebentos alveolares, maximiza o número de focos de iniciação tumoral [138, 377]. O DMBA liga-se ao receptor de hidrocarboneto, no citosol, que fica activado e efectua uma translocação para o núcleo onde se associa a uma proteína de translocação. Este complexo liga-se a locais específicos do DNA e aumenta o polipeptídeo1 da subfamília B, família 1 do citocromo P450 (*cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1, CYP1B1*) [380] que metaboliza o DMBA num epóxido intermediário mutagénico rapidamente formador de adutos com o DNA [378, 381]. O DMBA é mais absorvido pelas células em fase-S do ciclo celular, como é o caso dos TEB onde o ciclo celular é muito curto, de apenas 11h [138]. Se durante a fase G1, não houver uma reparação bem-sucedida, os defeitos genéticos são mantidos e é adicionada maior instabilidade cromossómica, o que facilita a iniciação tumoral [193, 378, 382]. O locus designado de *Mcs1*, actua como um determinante de susceptibilidade de grande importância para o desenvolvimento de neoplasias mamárias induzidas pelo DMBA [371]. Na maioria dos tumores de mama em rato e murganho, o DMBA causa uma transição do nucleósido adenina para timina no 61º codão do gene *H-ras* [370, 372, 377, 378]. Esta iniciação genética está associada à maioria dos tumores de mama quimicamente induzidos e é adjuvada pela mutação de genes reguladores de vias de sinalização como *NF-kB*, *Wnt*, *myc*, *p53*, entre outros [372, 378]. No entanto, a variabilidade genética confere resistência em alguns ratos [193]. Os adenocarcinomas induzidos por DMBA são hormonodependentes e bem caracterizados no que se refere a perfis de expressão génica [346, 371, 377].

O estrogénio é essencial para a formação tumoral e actua por expansão da população de células iniciadas, para além de que os seus metabolitos são genotóxicos para as células epiteliais mamárias com aumento da instabilidade genética [193, 372, 374, 377, 380]. Nessas condições, em vez da diferenciação, os TEB tornam-se progressivamente aumentados devido a proliferação epitelial com múltiplas camadas, formação de lúmens secundários e projecções papilares intraluminais denominadas de proliferações intraductais, carcinoma ductal *in situ* [138, 193, 365, 383, 384]. A maioria dos tumores decorrentes de trabalhos experimentais não mostra evidência clara de invasividade [210, 377], mas se a vida dos animais for longa o suficiente, estes cancros tornam-se invasivos e metastizam para os pulmões [193]. Da mesma forma que em humanos, os adenomas e fibroadenomas do rato são principalmente adenomas tubulares e fibroadenomas originados dos rebentos alveolares e lóbulos mamários [383].

Os carcinomas de mama do rato são muito heterogéneos com padrões variados como cribriforme, comedo ou papilar de grande semelhança com os tumores em humanos [138, 193, 210, 363, 365, 383-385]. Os mais frequentes são adenocarcinomas compostos por um padrão papilar ou papilar quístico [377]. A caracterização histopatológica diferencia as proliferações não-neoplásicas das proliferações neoplásicas benignas e malignas, com base em critérios citológicos e histológicos [211, 384]. A presença de atipia, perda do padrão tubuloalveolar, ausência de células mioepiteliais e invasão do estroma são critérios de malignidade fiáveis [210]. A classificação histopatológica dos tumores de mama do rato, anteriormente paralela à humana [386], foi adaptada com vista à uniformização e melhor comparação em patologia experimental com o uso de terminologia descritiva e de modificadores [138, 384, 387-389].

A utilização de terminologia descritiva usa a evidência do padrão histopatológico predominante [387, 389]. Os modificadores adicionam informação acerca do potencial biológico, propriedades inerentes ao tumor como atipia, necrose, secreção ou fibrose, e ainda topografia, etiologia e o contexto biológico/experimental [387, 389]. Assim, em patologia identifica-se o padrão histopatológico predominante seguido dos padrões secundários do tumor, determina-se o grau tumoral pelo NGS e discriminam-se características morfológicas adicionais relevantes na comparação com a patologia humana [386] como: invasividade, necrose, infiltração de células inflamatórias, microcalcificações, proporção do padrão cribriforme, reação do estroma, secreção e hemorragia [210, 384, 390]. A maioria dos carcinomas é de grau I sendo compostos por mais do que um padrão histopatológico, seguidos dos carcinomas de grau II e de grau III. No entanto, dentro de cada grau nuclear há ainda uma grande variedade na distribuição das características morfológicas adicionais [210, 390]. Assim, há uma necessidade crescente de metodologias preditivas e prognósticas mais precisas de aferição do comportamento fisiopatológico do tumor [74, 200, 390] como a análise multivariada [390]. A melhoria do NGS por análise de componentes principais permite uma discriminação dos graus tumorais convencionais com base em características histopatológicas, com a vantagem de melhorar a comparação deste modelo de carcinogénese com os tumores humanos [390]. Já a caracterização molecular por imunohistoquímica em rato não está suficientemente caracterizada para a transposição com os humanos [387].

Os grupos de genes analisados em tumores de rato por indução com DMBA são elucidativos das vias de carcinogénese semelhantes às encontradas em tumores humanos e por isso este modelo pode ser usado para estudo de vias de prevenção e terapêutica [383, 391, 392]. Os genes analisados estão relacionados com factores de crescimento e de diferenciação celular, vias de sinalização celular, factores de transcrição, metabolismo celular, homeostasia proteica, matriz extracelular e citoesqueleto, angiogénese, proliferação, invasão, marcadores tumorais e receptores hormonais [346, 383, 391-393].

Os modelos experimentais de estudo do cancro de mama que usa linhas celulares *in vitro* são altamente controladas e os resultados são reprodutíveis para além de que não carecem de considerações práticas e éticas necessárias aos estudos *in vivo* [5]. Mais ainda, muitas linhas de cultura de células replicam a caracterização molecular dos carcinomas de mama em humanos [55, 215]. Apesar destes modelos serem elucidativos de muitas vias moleculares, têm limitações importantes quando se pretende transpor o conhecimento para os modelos *in vivo*, por exemplo por ausência de contextualização quer no microambiente tumoral quer no sistema imunológico [5].

Capítulo II

Objetivos

Capítulo II

Objectivos

A exposição introdutória do capítulo anterior aborda a pluralidade da temática oncológica da glândula mamária em humanos e animais com muitas pontes de contacto, tanto teóricas como clínicas, e com necessidade de respostas terapêuticas mais eficazes, bem-toleradas e económicas. Neste âmbito, a emergência de métodos de abordagem com vista à eliminação e/ou modificação das células neoplásicas em todo o organismo e com desencadeamento de imunidade e diferenciação celular podem, em teoria, controlar a progressão destas patologias. Esse estudo normalmente tem início em culturas celulares, mas não dispensam os modelos experimentais *in vivo* que, antes de mais têm de ser caracterizados para uma melhor comparação e transposição para a medicina humana e veterinária.

No estudo que aqui se apresenta, procedeu-se à indução química de neoplasias mamárias em ratos-fêmea virgens da estirpe não-isogénica Sprague-Dawley e à sua caracterização e, posteriormente, com uma forte base teórica, fez-se a abordagem terapêutica por hipertermia focal e por modulação celular das células neoplásicas no sentido da diferenciação osteoblástica, tendo-se definido os seguintes objectivos:

1. Caracterização da glândula mamária normal. Pretende-se caracterizar o grupo I, controlo geral, quanto a curvas de crescimento, valores de hemograma e bioquímica sérica, macroscopia da glândula mamária normal e microscopia da glândula mamária normal por histopatologia e imunohistoquímica.
2. Caracterização das neoplasias mamárias induzidas por DMBA a 65mg/Kg aos 50 dias de idade, grupo II. Este grupo tem valor de comparação com os grupos onde se procedeu à indução neoplásica. A caracterização considerou os seguintes aspectos:
 - a. Determinação da taxa de indução de tumores de mama induzidos quimicamente por DMBA, 65mg/Kg diluído em azeite, por administração intragástrica aos 50 dias de idade.
 - b. Avaliação do efeito dos tumores na curva de crescimento dos animais.

- c. Caracterização macroscópica das neoplasias em função da sua incidência por animal e da localização na cadeia mamária do rato, considerando a linha mamária esquerda numerada de 1-6 no sentido craneal-caudal e a linha mamária direita numerada de 6-12 no sentido craneal-caudal. Determinação do volume e do peso e semiquantificação das características macroscópicas relativas aos seguintes parâmetros: forma, tonalidade, consistência, presença/ausência de cápsula, superfície externa, tonalidade e consistência da superfície de secção.
 - d. Caracterização histopatológica de cada tumor, quanto ao padrão tumoral, grau do tumor e caracterização semiquantitativa de características tumorais relevantes descritas na literatura [210] e respectiva análise estatística por PCA.
 - e. Caracterização microscópica por histoquímica com tricrómico de Masson e azul de toluidina para semiquantificação do tecido conjuntivo e quantificação de mastócitos, respectivamente e respectiva avaliação estatística.
 - f. Caracterização imunohistoquímica para os marcadores: receptor de estrogénio, Ki67, caspase 3, CD3, HSP70 e osteopontina e respectiva avaliação estatística das imunomarcações.
3. Caracterização dos efeitos locais e sistémicos da aplicação da hipertermia altamente focalizada por injeção intratumoral no tumor de mama de maior dimensão, através da excitação electromagnética de um material com propriedades ferrimagnéticas, *vulgo* cimento, o que compreende:
- a. Avaliação dos efeitos sistémicos e locais da aplicação do material ferrimagnético em mama normal através da análise de hemograma e bioquímica sérica e da análise histopatológica e imunohistoquímica do tecido mamário para os marcadores: receptor de estrogénio, Ki67, caspase 3, HSP70, CD3 e osteopontina.
 - b. Avaliação macroscópica do tumor tratado e dos tumores não tratados relativamente ao volume, peso e semiquantificação dos parâmetros: forma, tonalidade, consistência, presença/ausência de cápsula, superfície externa, tonalidade e consistência da superfície de secção.
 - c. A avaliação da aplicação da hipertermia focal no tumor de maior dimensão por análise histopatológica e imunohistoquímica do tumor tratado e dos tumores não tratados.
4. Avaliar individualmente a terapia complementar com administração de vitamina D₃ e com administração conjunta de vitamina D₃ e dexametasona e proceder à sua análise comparativa, o que inclui:
- a. Avaliar os efeitos sistémicos e tecidulares da terapia complementar por administração parenteral de vitamina D₃ e por administração conjunta de vitamina D₃ e dexametasona, através da análise de hemograma e bioquímica sérica e análise histopatológica e imunohistoquímica do tecido mamário e a sua comparação com o tecido mamário normal de animais controlo.
 - b. Avaliar os efeitos da administração parenteral de vitamina D₃, e da administração conjunta de vitamina D₃ e dexametasona, nos tumores de mama induzidos por DMBA através de hemograma e bioquímica sérica, avaliação macroscópica e microscópica por histopatologia e imunohistoquímica dos tecidos neoplásicos e a sua comparação com as neoplasias sem outra manipulação.

Materiais e Métodos

Capítulo III

Protocolo de termoterapia focal - 105

Protocolo de terapia complementar - 108

Técnicas de histoquímica e métodos de avaliação - 108

Métodos estatísticos - 113

Método de imunohistoquímica - 110

Capítulo III

Materiais e Métodos

O protocolo experimental desta investigação foi submetido e aprovado pela Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, ao abrigo do disposto na Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro, e de acordo com as normas Europeias em vigor.

Neste estudo experimental foram utilizados animais da espécie *Rattus norvegicus*, vulgos ratos, da estirpe Sprague-Dawley (SD), fêmeas virgens, com 50 dias de idade, provenientes do Laboratório Charles River e teve a duração de 27 semanas, tendo sido precedido de um período de quarentena de oito dias.

A indução das neoplasias da mama (IND) foi feita pela administração por gavagem de 7,12-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) na dose de 65mg/Kg, sendo o veículo o azeite virgem. O rendimento de indução (quociente entre o número de animais com alterações neoplásicas e o número total de animais sujeitos ao protocolo de indução carcinogénica a multiplicar por 100, %) previsto era superior a 70% [138, 385].

Os animais foram vigiados diariamente e pesados semanalmente.

No protocolo de termoterapia focal (TPF) os animais foram sujeitos a uma inoculação, no centro do tumor de maiores dimensões, de partículas ferrimagnéticas envolvidas numa cerâmica (cimento), e expostos a estimulação electromagnética durante 30 minutos com um segundo ciclo de hipertermia 48h depois. Em alguns animais foi feita uma terapia complementar (TC) por aplicação de moléculas que direccionam a diferenciação celular no sentido da linha osteoblástica (colecálciferol e colecálciferol com dexametasona) com o objectivo de explorar a diferenciação induzida nas lesões neoplásicas. Os animais foram colocados aleatoriamente em grupos de três e mantidos a uma temperatura ambiente de 23°C +/-2°C, humidade de 50-55%, com ciclos sequenciais de 12h de luz e 12h de escuridão e alimentados com a dieta padrão do biotério. O alimento e a água foram fornecidos *ad libitum*. O sacrifício de todos os animais foi feito no cumprimento das normas de bem-estar animal e toda a experiência decorreu em condições padronizadas de acordo com a legislação em vigor. À necrópsia colheram-se amostras de sangue para o estudo de alguns parâmetros de clínica laboratorial nos grupos I, III, IV e VI. O sangue de cada animal foi colocado em tubo de com anticoagulante de EDTA para análise de hemograma e num tubo seco para formação de soro e análise de parâmetros da bioquímica sérica. Os tubos foram, de seguida, colocados em refrigeração entre 3-5°C durante um período não superior a 3 horas, o que, segundo Cora, 2012 [394], não introduz elementos artefactuais nos parâmetros analisados. A analítica laboratorial ao hemograma incluiu a quantificação de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio (VGM), hemoglobina corpuscular média (HCM),

concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos e respectivo leucograma e plaquetas. Os parâmetros analisados de bioquímica sérica incluíram: glicose, colesterol, triglicéridos, ureia, creatinina, cálcio total, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina e lactato aminotransferase. Na Tabela 15 encontra-se o intervalo de referência dos parâmetros analisados e as unidades de medição, para ratos fêmea com 17 ou mais semanas de idade [395].

Tabela 15 – Parâmetros de clínica laboratorial ao hemograma e bioquímica sérica avaliados nos grupos I, III, IV e VI. Indicação dos valores de referência considerados normais em ratos fêmeas com 17 ou mais de semanas de idade, conforme [395].

Parâmetros de hemograma	Intervalo de referência	unidades	Parâmetros de bioquímica sérica	Intervalo de referência	unidades
Eritrócitos	7,16-9,24	milh/ml	Glicose	89-163	mg/dl
Hemoglobina	13,7-17,2	g/dl	Colesterol Total	23-97	mg/dl
Hematócrito	38,5-49,2	%	Triglicéridos	16-175	mg/dl
V. G. Médio	50,3-57	fl	Ureia	11,7-25	mg/dl
H. C. Média	17,6-20,3	pg	Creatinina	0,3-0,6	mg/dl
C.H.C.Média	33,2-37,8	g/dl	Cálcio Total(S)	9,5-12,1	mEq/l
Leucócitos	0,96-7,88	10 ³ /ml	Bilirrubina Total	0,07-0,21	mg/dl
Fórmula Leucocitária			Bilirrubina directa	0,03-0,07	mg/dl
			Bilirrubina indirecta	0,02-0,13	mg/dl
Neutrófilos	0,15-1,11	10 ³ /ml	AST	64-222	u/l
Eosinófilos	0,01-0,14	10 ³ /ml	ALT	14-64	u/l
Basófilos	0-0,02	10 ³ /ml	Fosfatase Alcalina	18-62	u/l
Monócitos	0,01-0,13	10 ³ /ml	Proteínas totais	5,7-8,3	g/dl
Linfócitos	0,68-6,8	10 ³ /ml	Albumina	3,7-5,8	g/dl
Plaquetas	599 000 - 1144 000	ml	LDH	256-1552	u/l

Em todos os animais, o exame *post-mortem* foi completo o que incluiu a pesagem para determinação do peso corporal, a medição da distância nariz-ânus e nariz-cauda, o cálculo do índice de Lee, a avaliação morfológica da gordura peri-renal, registaram-se as medidas do baço e coração e o peso dos seguintes órgãos: baço, fígado, rins, pulmões, ovários, útero e coração. Nos animais com neoplasia mamária, adicionou-se o registo tumoral individual com identificação da localização, segundo a numeração das glândulas mamárias, de 1-12, sendo a cadeia mamária esquerda numerada de 1-6 no sentido craneal-caudal e a cadeia mamária direita numerada de 6-12 no sentido craneal-caudal (Figura 48), baseado e adaptado de Veltmaat, 2013 [175].

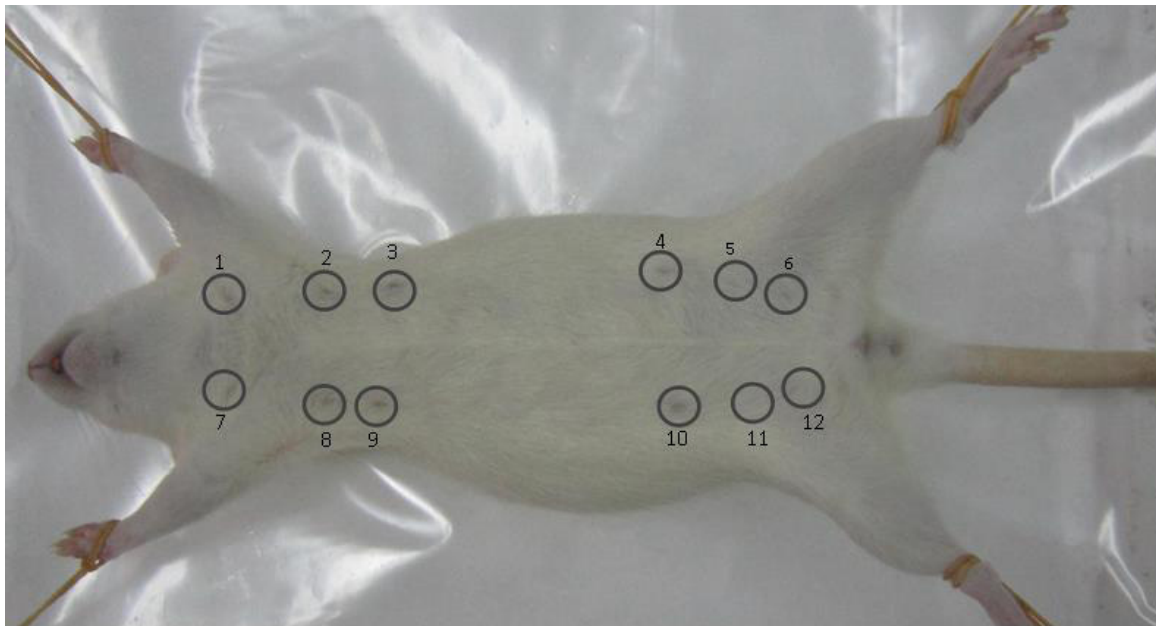


Figura 48 – Rato da estirpe Sprague-Dawley. Marcação numérica das glândulas mamárias.

A macroscopia do tumor foi descrita pelos seguintes parâmetros: determinação do comprimento dos três eixos ortogonais (D1, D2 e D3) para cálculo volumétrico de uma esfera [$2/3 \cdot \pi \cdot (D1 \cdot D2 \cdot D3)$], peso, forma, tonalidade, consistência, presença/ausência de cápsula, superfície externa, tonalidade e consistência da superfície de secção.

Constituíram-se seis grupos de estudo numerados de I-VI (Tabela 16).

O grupo I foi formado por animais sem qualquer manipulação, ou seja pelo grupo de controlo.

O grupo II foi formado pelos animais submetidos ao protocolo de indução da neoplasia (IND).

O grupo III foi formado pelos animais submetidos à inoculação do cimento na mama inguinal direita, M12, para avaliação da biocompatibilidade por histopatologia.

O grupo IV foi formado pelos animais submetidos ao protocolo de terapia complementar (TC) a partir da 24ª e até à 26ª semana para avaliação dos efeitos sistémicos na ausência de tumores.

O grupo V foi formado pelos animais submetidos ao protocolo de indução da neoplasia (IND) e, à 26ª semana, ao protocolo de termoterapia focal (PTF), em dois ciclos de 30 minutos separados por 48h.

O grupo VI foi formado pelos animais submetidos ao protocolo de indução da neoplasia (IND) e ao protocolo de terapia complementar (TC) a partir da 24ª e até à 26ª semana para avaliação da diferenciação das células neoplásicas no sentido da linha osteoblástica.

Tabela 16 – Resumo dos grupos e das respectivas manipulações a que foram submetidos os animais incluídos neste estudo. N – dimensão da amostra; IND – indução da neoplasia; PTF – protocolo da termoterapia focal; TC – terapia complementar.

Grupo	N	IND	Cimento	PTF	TC Vitamina D3	TC Dexametasona	Análítica sanguínea
I	6	0	0	0	0	0	+
II	31	+	0	0	0	0	0
III	6	0	+	0	0	0	+
IV	a	5	0	0	+	0	+
	b	6	0	0	+	+	+
V	19	+	+	+	0	0	0
VI	a	4	+	0	+	0	+
	b	7	+	0	+	+	+

0, Sem procedimento; +, Com procedimento

Protocolo de termoterapia focal

Na preparação do protocolo de TF, a inoculação do cimento fio feita com os animais anestesiados com uma combinação de cetamina (80-100mg/kg) e xilazina (5-10mg/kg) administrada por injeção intraperitoneal. Na pele que recobre o tumor fez-se a tricotomia com lâmina cortante seguida de assepsia com clorhexidina a 1%. O cimento é um pó fino de composição química, baseada na percentagem em peso de óxidos, 10SiO_2 , $2\text{Al}_2\text{O}_3$, $52\text{Fe}_2\text{O}_3$, $0,6\text{MgO}$, 33CaO , $2,4(\text{SiO}_3+\text{K}_2\text{O})$, formado por partículas com dimensão máxima de $5\ \mu\text{m}$. Pesou-se 1g de cimento em pó, em balança de precisão centesimal (Mettler PJ3000), ao qual foi adicionada água destilada estéril para obtenção de uma pasta (Figura 49) numa proporção pó/água aproximadamente de 5:1, que, com pressão firme de 1Kgf, resulta num valor de injectabilidade correspondente a $90\% \pm 1\%$ do volume total de pasta de cimento durante 5 minutos após a sua preparação, conforme Portela A, et al. [396].

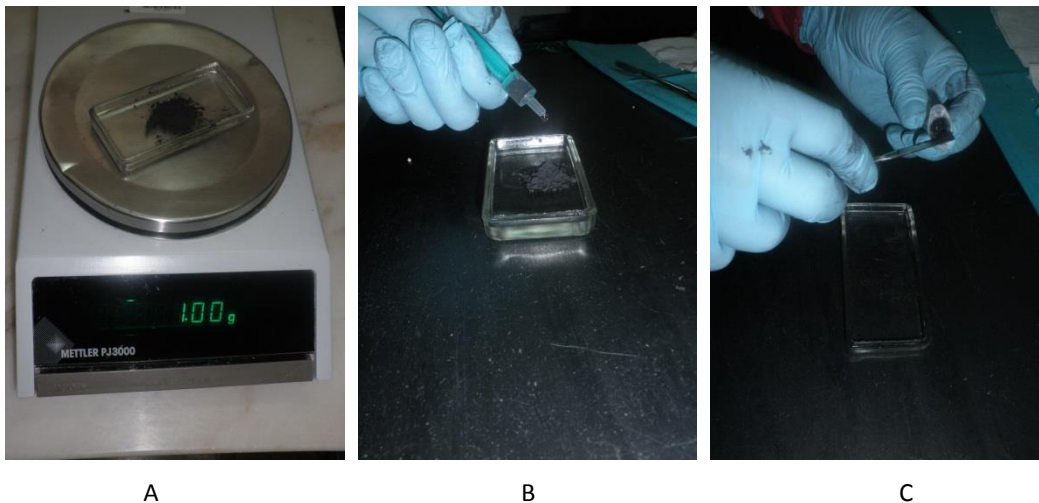


Figura 49 – Preparação do cimento ferrimagnético para inoculação intratumoral. A) Pesagem de 1g de cimento em pó numa base de vidro em balança de precisão centesimal. B) Adição de água destilada estéril para obtenção de uma pasta com volume aproximado de 1ml. C) Introdução da pasta de cimento numa seringa de 5ml.

No grupo III, o cimento foi injectado à 26ª semana na almofada lipídica correspondente à mama inguinal direita, M12, seguindo os passos de preparação anestésica, tricotomia e inoculação já descritos. A aplicação do cimento aos animais do grupo V, igualmente à 26ª semana, foi seguida do protocolo de TF. O cimento foi inoculado na neoplasia subcutânea de maiores dimensões, onde é possível, por palpação, obter uma informação suficiente da geometria da lesão. No local de inoculação foi feita tricotomia para melhorar a leitura térmica pela câmara de termografia. A inoculação deste preparado ocorreu durante a fase líquida, no interior da maior neoplasia, na sua porção mais interna relativamente à superfície externa da neoplasia, por agulha hipodérmica de 16-gauge, tornando-se sólido poucos minutos após a sua colocação (Figura 50). Os tumores maiores foram inoculados com um volume máximo de 1ml e os tumores menores foram inoculados com o máximo volume que comportavam de modo a prevenir a rotura. A distribuição do cimento dentro do tumor foi avaliada por radiografia (Trophy CCX *digital computer controlled X-ray*) em projecção ventro-dorsal e latero-lateral (Figura 50).

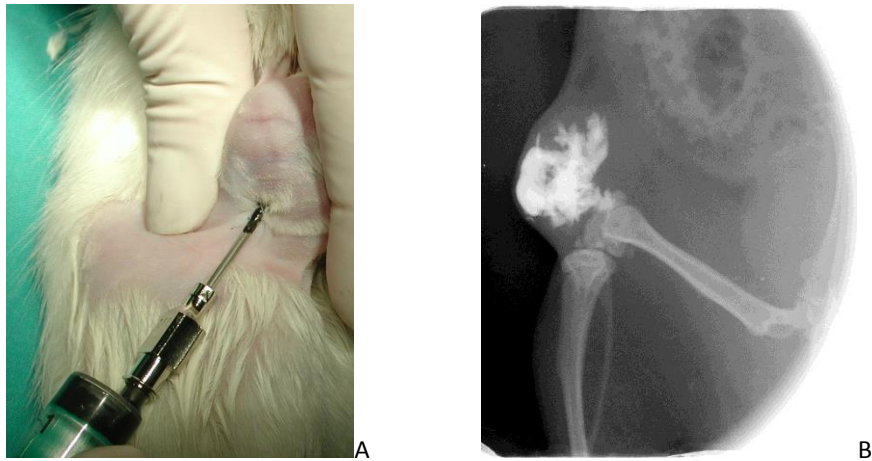


Figura 50 – Inoculação do cimento e monitorização da distribuição espacial dentro do tumor através de radiografia. A) Inoculação do cimento através de agulha de 16 gauge no centro do volume tumoral palpado. B) Radiografia em projecção lateral do tumor inoculado. Imagem original.

Ainda sob o efeito da anestesia, cada animal foi colocado num adaptador de bobina (Figura 51), de modo a permanecer imóvel com a zona tumoral de interesse exposta e acessível à monitorização térmica, conforme se indica adiante. O adaptador foi construído para este trabalho pelo Professor Doutor José Tinoco Cavalheiro.



Figura 51 – Adaptador de bobina para hipertermia em rato. O animal é colocado na vertical tendo um apoio regulável para a cabeça na porção inferior do tubo. A região tumoral de interesse fica ao nível da maior abertura.

O adaptador foi colocado numa bobina vertical de 110mm de diâmetro e de 12 voltas ligada um a um sistema electrónico indutor de alta frequência, 10KHz, K10/RV (CALAMARI, Milan, Italy) durante 30 minutos, tendo-se induzido hipertermia altamente focalizada no tumor exposto. Outro ciclo hipertérmico foi repetido 48h depois. A temperatura foi monitorizada através de uma câmara de termografia, FLIR A325 (Wilsonville, OR, USA), e analisada com recurso ao *software* ThermaCAMTM *Researcher Professional* 2.9 (FLIR) (Figura 52). Durante o ciclo de hipertermia a temperatura foi controlada por ajustado manual para manter temperatura tumoral constante nos 43°C. A paleta de cores da câmara de termografia variava dos 19,5°C a 43°C e a área em avaliação, definida por um círculo no *software*, marcava o máximo. Espera-se que a variação da temperatura na superfície, obtida por imagem superficial em duas dimensões com infravermelhos, corresponda à variação da temperatura no tumor. Conforme Portela et al. 2013, um grupo controlo sem cimento foi exposto à radiação electromagnética descrita, não tendo havido aumento da temperatura tumoral nesses animais. Estes dados foram usados para reduzir o número de animais envolvidos neste estudo.



Figura 52 – Tratamento hipertérmico com monitorização por câmara de termografia.

Protocolo de terapia complementar

Nos grupos IV e VI, o protocolo de terapia complementar decorre semanalmente em dois subgrupos, denominados pelas letras minúsculas, a e b, a partir da 24^a, até à 26^a semana.

No subgrupo a, os animais foram administrados apenas com colecalciferol 20µg/Kg por via intraperitoneal (IP) e no subgrupo b foram administrados semanalmente com colecalciferol 20µg/Kg IP e fosfato sódico de dexametasona (Vetacort[®], Vétoquinol) na dose de 0,5mg/Kg por via intramuscular (IM). O fármaco comercial de vitamina D₃ (Duphafra[®] D₃ 1000 solução injectável) contém 1,000,000UI que corresponde a 25mg/ml (1UI = 0,025µg). Para se conseguir um volume injectável medido com rigor, fez-se a diluição de 10µl de colecalciferol em 5ml de azeite virgem e homogeneizou-se a solução com magnete durante 30 minutos. Nesta diluição, a dose pretendida de vitamina D₃ (20µg/Kg) corresponde a 0,4ml/Kg da solução preparada. O volume por animal era ajustado de acordo com o peso.

Técnicas de histoquímica e métodos de avaliação

Nos grupos sem indução neoplásica pelo DMBA, grupo I, III e IV, a glândula mamária inguinal direita, M12, foi colhida para avaliação microscópica com o mesmo procedimento histopatológico que a seguir se descreve para os tecidos neoplásicos.

Nos grupos com indução neoplásica, grupo II, V e VI, as lesões mamárias macroscópicas foram colhidas e fixadas em formol tamponado a 10% e processadas, para desidratação, por um sistema automático convencional. Em seguida fez-se a sua inclusão em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em secções de 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE), segundo o protocolo de rotina. As preparações histopatológicas foram examinadas pela autora deste trabalho que tem experiência em anatomia patológica veterinária. As lesões epiteliais foram classificadas em não neoplásicas ou neoplásicas, tendo estas sido classificadas segundo os critérios histopatológicos publicados por Russo, J., & Russo, I. H. (2000) [384], em função do padrão histológico mais prevalente, seguido dos restantes padrões histológicos presentes, por ordem de prevalência. A graduação histopatológica dos tumores seguiu os parâmetros morfológicos usados em patologia mamária humana que inclui a semiquantificação em três níveis dos parâmetros: formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses, de acordo com o esquema de graduação de *Nottingham Grading System* (NGS) [386]. A formação tubular foi classificada em I, se mais de 75% do tumor apresentasse esta diferenciação, em II, se as formações tubulares ocupassem uma área entre 10% e 75% e em nível III se fossem observados numa área inferior a 10%. O pleomorfismo nuclear, também conhecido como grau nuclear, inclui três categorias (I, II e III), dependendo do tamanho e forma do núcleo, padrão de cromatina e presença ou ausência de nucléolos. Os núcleos de grau I são aqueles que apresentam pouca variação relativamente às células de origem, os núcleos de grau II apresentam tamanho aumentado e variação moderada na forma com aumento do tamanho e número dos nucléolos e os núcleos de grau III são marcadamente pleomórficos, com

padrões de cromatina muito densa, vacúolos nucleares e macronúcleolos com pleomorfismo nucleolar. A actividade mitótica segue igualmente três níveis de classificação de acordo com o número de mitoses presente em 10 campos de grande aumento (*high perfusion field*, HPF), nas áreas tumorais mais indiferenciadas e celulares. Os limites para a graduação das contagens dependem do diâmetro de campo do microscópio óptico [365, 397].

Neste trabalho, usou-se um microscópio (NikonEclipse E-600), onde campo de visão mede 0,625mm, pelo que a contagem de mitoses é graduada em 1 se a soma dos dez campos avaliados com ampliação de 400x estiver no intervalo entre 0-11 mitoses, em nível 2, se estiver entre 12-22 mitoses e atribuem-se 3 pontos quando contabilizam mais de 23 mitoses nos dez campos observados. A combinação aditiva destes três parâmetros resulta num valor mínimo de três e máximo de 9 pontos. O grau do tumor é classificado em três níveis. Quando a soma dos pontos atribuídos aos três parâmetros descritos se situa entre 3 e 5, os tumores consideram-se de grau I, sendo entendidos como bem diferenciados, os tumores com um somatório total de 6 ou 7 pontos são de grau II, considerados moderadamente diferenciados e os tumores de grau III obtêm somas de 8 ou 9 pontos, sendo tumores pouco diferenciados.

De acordo com Costa et al., 2002 [210], outros parâmetros foram também analisados e graduados em quatro níveis (0, 1, 2 e 3). Na ausência do parâmetro estudado classificava-se com 0, se presente de forma residual, atribuía-se o nível 1, a presença moderada correspondia ao 2 e uma presença abundante tomava o valor de 3. Os parâmetros assim classificados foram a presença de necrose, infiltrado inflamatório, hemorragia, secreção e reacção do estroma. A predominância do padrão cribriforme recebeu uma especial atenção já que é um padrão considerado indicador de malignidade e por isso foi graduado em 1, se presente numa percentagem entre 0-30%, em 2, se ocupava sensivelmente metade da área tumoral, ou seja entre 40-60% e em 3, para uma prevalência superior. A invasão do estroma e a microcalcificação foram classificadas como ausentes, nível 0, ou presentes, nível 1.

A reacção do estroma foi aferida através da coloração histoquímica tricrómico de Masson que cora selectivamente de azul as fibras de colagénio e as fibras de reticulina, genericamente indicadas como tecido conjuntivo ou estroma, em contraste com o tecido muscular e epitelial que cora de vermelho e os núcleos de preto. Nestas preparações, a quantidade de tecido conjuntivo foi graduada em três níveis em função da quantidade de estroma corado. Assim os tecidos com quantidade residual foram classificados com o nível 1, com quantidade moderada de tecido conjuntivo, com o nível 2 e com o nível 3, quando a quantidade de estroma corado de azul era intensa.

Os mastócitos foram evidenciados pela coloração Azul de toluidina pela metacromasia dos seus grânulos. A intensidade de mastócitos foi quantificada pela soma do número de mastócitos presente em 10 campos com aumento de 100x. Nas preparações histopatológicas coradas por HE onde se verificou a presença de pigmentos intracelulares amarelo acastanhados, aplicaram-se as técnicas histoquímicas pela coloração especial do azul da prússia, para detecção de ferro, a coloração Ziehl Neelsen para substâncias álcool-ácido resistentes e a coloração de *periodic acid schiff* (PAS) para marcação de carboidratos neutros, tendo-se usado os protocolos de rotina da técnica de anatomia patológica.

Método de imunohistoquímica

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 3 μ m e colocados em lâminas de vidro adesivadas com silane, tendo-se seguido a secagem em estufa a 37°C durante 12h para posterior desparafinação e re-hidratação em soluções de concentração decrescente de álcool. A recuperação antigénica foi feita numa solução tampão de citrato de sódio a 10 mmol/L com pH 6 em panela de pressão durante 3 minutos. Colocaram-se então as lâminas numa câmara húmida de IHC e fez-se uma delimitação do tecido com caneta hidrofóbica (Novocastra™ NCL-PEN, Leica). A imunomarcação por anticorpos primários com origem em coelho ou ratinho foram efectuadas pelo método comercial com polímero enzimático Novolink™ Max-Polymer (Novocastra) (Figura 53 - A). A peroxidase endógena foi bloqueada por uma solução comercial com peróxido de hidrogénio (Novocastra™ bloqueio da peroxidase, peróxido de hidrogénio a 3–4%). Seguiram-se as etapas de bloqueio das proteínas (Novocastra™ bloqueio das proteínas, caseína a 0,4% em soro com tampão fosfato e produtos estabilizadores e surfactantes) e aplicação do anticorpo primário diluído em solução de albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA) a 5%, consoante a diluição recomendada para cada anticorpo (Tabela 17). 100 μ l da solução foram colocados em cada preparação (Figura 53 - B), seguindo-se um período de incubação em câmara húmida, a 4°C durante 12 a 16h. Aplicou-se o anticorpo pós-primário (Novocastra™ *post-primary*, IgG de coelho anti-ratinho (<10 μ g/mL) em soro animal a 10% (v/v) em solução salina tamponada) e adicionou-se o polímero enzimático (*horseradish peroxidase*, HRP) (Novolink™ polimer, Poly-HRP-IgG anti-coelho).

A imunomarcação pelo anticorpo Ki67, clone Mib5, foi feita pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase. Nesta metodologia no bloqueio das proteínas usou-se soro normal de coelho numa diluição de 1/5 em BSA a 10%. O anticorpo pós-primário usado – soro de ponte – foi o coelho anti-rato diluído em 1/200 em BSA a 5%. Colocou-se, então, a solução previamente preparada com complexo avidina-biotina numa diluição a 1% de avidina e biotina em BSA a 5%, que incubada durante 30min. Em ambas as técnicas, fizeram-se lavagens duplas em TBS de 5min cada.

Para o desenvolvimento de marcação cromática usou-se uma solução comercial (Novocastra™ DAB chromogen, 3,3' - diaminobenzidina a 1,74% p/v, numa solução estabilizadora) com uma solução de peróxido de hidrogénio (Novocastra™ DAB substrate buffer, solução tamponada contendo peróxido de hidrogénio a \leq 0,1% e um produto conservante) numa proporção de 1ml de tampão para 50 μ l de cromogénio, durante 5min. As lâminas, depois de lavadas, foram contrastadas com hematoxilina, desidratadas e diafinizadas para montagem com lamela. Em todos os ensaios de IHC de todos os anticorpos a técnica foi validada com a inclusão de controlos positivos adequados aos anticorpos utilizados.

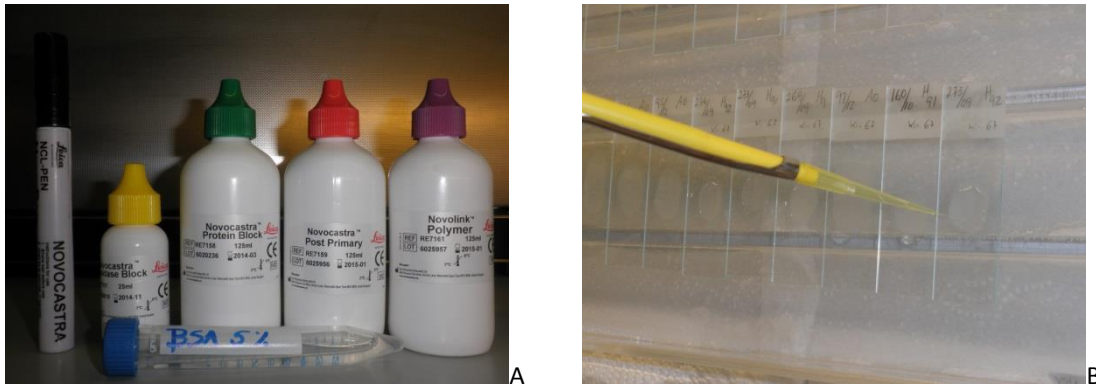


Figura 53 – Produtos comerciais utilizados no método comercial com polímero enzimático, A. Câmara húmida com preparações em fase de aplicação do anticorpo primário do processo de marcação por imunohistoquímica.

Descrevem-se agora os anticorpos primários usados em IHC (Tabela 17) e as suas características gerais. O receptor de estrogénio foi marcado por um anticorpo monoclonal, 6F11, a partir de IgG1 de ratinho (Novocastra™) na diluição de 1:50. O receptor do estrogénio tem uma localização exclusivamente nuclear assim como a sua imunomarcação.

O anticorpo monoclonal anti Ki67, clone Mib-5, (DakoCytomation) produzido a partir de uma linha celular de rato foi usado numa diluição de 1:100. O Ki67 marca células em divisão em qualquer fase do ciclo celular, sendo a imunomarcação exclusivamente nuclear.

O anticorpo anti-caspase 3 (Asp175, Cell Signaling Technology, Inc., USA) foi usado para marcar a apoptose na diluição de 1:100 e a marcação localiza-se no citoplasma.

O anticorpo anti-HSP70, clone W27, foi produzido a partir de uma linha celular de ratinho HeLa (Thermo Fisher Cientific). Este anticorpo reconhece tanto a forma constitutiva da HSP70, HSP73, como a forma induzida, HSP72. Neste estudo foi usado na diluição de 1:100 e a imunomarcação pode ser citoplasmática ou nuclear.

O anticorpo anti-CD3 humano, policlonal com origem em Coelho (DakoCytomation) marca linfócitos T auxiliares de linfócitos T citotóxicos e tem reactividade cruzada com rato. Foi usado na diluição de 1:50 e a imunomarcação é membranar.

O anticorpo monoclonal anti-osteopontina (O-17) de rato, anti-peptídeo sintético N-terminal, produzido em coelho, com purificação das imunoglobulinas IgG (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.). Este anticorpo foi usado na diluição de 1:100 e a imunomarcação relevante para este estudo localiza-se no estroma dos tecidos.

Tabela 17 – Anticorpos primários utilizados neste estudo.

Anticorpo	Clone	Tipo	Animal de origem	Laboratório de origem	Diluição
Anti-ER	6F11	Monoclonal	Ratinho	NovocastraTM	1:50
Ki67	Mib-5	Monoclonal	Ratinho	DakoCytomation	1:100
Caspase 3 (ASP175)		Policlonal	Coelho	Cell Signalling Technology	1:100
Anti-HSP70	W27	Monoclonal	Ratinho	Thermo Fisher Cientific	1:100
Anti-CD3		Policlonal	Coelho	DakoCytomation	1:50
Anti-osteopontina		Monoclonal	Coelho	Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.	1:100

A imunohistoquímica é uma técnica exigente sob variados aspectos, pelo que o número de preparações submetidas foi reduzido relativamente à análise histopatológica. Todos os grupos foram avaliados por imunohistoquímica tendo havido algumas diferenças quanto aos anticorpos usados e quanto ao número de amostras submetidas. Os grupos I e II foram avaliados para todos os anticorpos. O grupo III foi avaliado para Ki67, caspase 3, HSP70, CD3 e osteopontina. O grupo V foi avaliado para os mesmo anticorpos que o grupo III adicionado do receptor de estrogénio. O grupo IV foi avaliado para Ki67, caspase 3, CD3 e osteopontina, tal como o grupo VI, mas neste último o anticorpo anti-receptor de estrogénio também foi usado. Na Tabela 18 tem-se uma abordagem resumida dos anticorpos utilizados nos grupos que compõem este estudo e do número de preparações avaliadas em cada caso

Tabela 18 – Resumo da avaliação por imunohistoquímica aos grupos que compõem este estudo e respectivo número de preparações submetidas a avaliação.

Anticorpos	Grupos											
	I	N	II	N	III	N	IV	N	V	N	VI	N
ER	+	6	+	14	-	0	-	0	+	12	+	12
Ki67	+	5	+	12	+	2	+	7	+	12	+	13
Caspase 3	+	6	+	14	+	2	+	11	+	12	+	12
HSP70	+	2	+	7	+	2	-	0	+	12	-	0
CD3	+	6	+	14	+	2	+	7	+	12	+	13
Osteopontina	+	6	+	14	-	0	+	11	-	0	+	12

ER – *Estrogen receptor*

A avaliação das preparações de IHC decorreu por microscopia de luz num microscópio NikonEclipse E-600. A imunomarcação celular foi traduzida pelo parâmetro quantitativo, aferido em percentagem de células marcadas, por contagem de 100 células ao acaso em dez campos de grande aumento (ampliação de 400x), localizados na periferia do tumor ou, nos animais sem tumores, em ácinos de glândula mamária normal, tendo-se evitado as áreas de necrose e de hemorragia.

A intensidade de marcação foi aferida em três níveis, sendo que às células com marcação ligeira foi atribuído o nível 1, as que apresentavam com marcação moderada, o nível 2 e com marcação intensa o nível 3. No caso do anticorpo CD3, marcador de linfócitos T, distinguiram-se as células positivas à imunomarcação conforme a sua localização fosse no parênquima tumoral ou no estroma tumoral. No caso da HSP70, distinguiram-se as células positivas conforme a sua localização fosse luminal ou basal dentro do alvéolo mamário. Para o anticorpo anti-osteopontina, a marcação do estroma foi aferida da seguinte forma: quando a marcação era ausente, atribuiu-se o nível 0, as preparações com marcação residual foram classificadas com o nível 1, quando a marcação do estroma era moderada considerava-se o nível 2 e o nível 3 foi atribuído aos tecidos com imunomarcação forte.

Métodos estatísticos

A caracterização histopatológica do modelo experimental foi feita pela análise das componentes principais (*principal components analysis*, PCA) aos tumores do grupo II, tendo-se também incluído outros tumores de estudos onde a carcinogénese seguiu a mesma metodologia com o objectivo de aumentar o universo de elementos em análise para um total de 148 tumores provenientes de 48 ratos, já que a heterogeneidade das neoplasias é muito grande dentro de cada grau tumoral. Os valores dos parâmetros foram integrados por PCA, que é uma técnica simples e não-paramétrica de extracção de informação relevante de bases de dados onde as variáveis mais influentes são reveladas e os factores mais relevantes e, neste estudo, mais tendenciosos com os graus do tumor são revelados e identificados [398]. Neste trabalho, a PCA sumariza a informação contida na base de dados, obtida através da semiquantificação das preparações histopatológicas do grupo II de modo a obter-se o mapeamento dos tumores produzidos por este modelo experimental. O espaço multidimensional original, definido pelos parâmetros avaliados em histopatologia, foi contraído em dimensões descritivas que representam as maiores variações dos dados. Cada componente principal (*principal component*, PC) é graficamente representada e analisada em separado e o seu significado pode ser interpretado de acordo com os descritores simples. Na sua essência, este procedimento é levado a cabo pela transformação linear de m parâmetros histológicos x_i numa componente principal u_i .

$$u_i = w_{i1}x_1 + w_{i2}x_2 + \dots + w_{im}x_m$$

Onde $w_{i1} \dots w_{im}$ são o factor ponderal dos parâmetros observados na combinação linear [399].

Na PCA, a matriz original X ($n \times m$), onde n linhas correspondem a n tumores e m colunas correspondem ao número de parâmetros histopatológicos, é decomposta num produto de duas matrizes,

$$X = SW^T$$

nas quais $S(n \times m)$ é a matriz dos *scores*, i.e., as coordenadas das amostras nas componentes principais e $W (m \times m)$ e a matriz *loading*. Como a primeira componente principal retém a maioria da variação, algumas variáveis podem ser sumariadas por umas poucas componentes tendo em conta que um conjunto com as primeiras duas ou três PCs possibilita a visualização da maioria da informação contida na base de dados. A definição e computação das componentes principais são, então, directas e está demonstrado que esta técnica aparentemente simples é extremamente útil com aplicações muito variadas [400-403]. Em investigação oncológica a PCA tem sido usada para processar dados e extrair variáveis significativas [403-408].

O procedimento baseado no PCA requer a descrição dos objectos em pontos no espaço Euclidiano. Neste estudo, os tumores correspondem aos objectos. Cada tumor é descrito numa base de 14 componentes relacionadas com a prevalência dos parâmetros histopatológicos. Especificamente, a base de dados é composta por 148 tumores provenientes do grupo II deste estudo e de outros que foram aqui incluídos, por terem sido induzidos com a mesma metodologia de indução carcinogénica com DMBA e mantidos durante o mesmo tempo, de modo a se obter um universo mais alargado. Os tumores foram caracterizados em 14 parâmetros microscópicos incluindo o número e tipo de padrão estrutural (NPAD), proporção de padrão cribriforme (PCRI), presença de microcalcificações (MIC), invasão do estroma (IEST), necrose (NEC), hemorragia (HEM), infiltrado celular inflamatório (INF), secreção glandular (SEC), áreas tubulares (ATUB), grau nuclear (GNUC), número de mitoses (NMIT), grau do tumor (GRA), reacção do estroma (REST) e apoptose (APO).

Os cálculos das estatísticas descritivas básicas foram efectuados utilizando o programa IBM SPSS V 17.0. Os pressupostos da distribuição normal das variáveis contínuas (parâmetros hematológicos e bioquímicos sanguíneos, características macroscópicas e histológicas dos tumores) e da homogeneidade das correspondentes variâncias foram confrontados pelo teste de Shapiro-Wilk e teste de Levene, respetivamente. Nas situações nas quais se verificava a violação do pressuposto da normalidade, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes foi utilizado para investigar se as distribuições do peso, volume e dimensões eram as mesmas nos diversos grupos e graus de malignidade tumoral. Quando a hipótese nula da distribuição normal das variáveis contínuas não era rejeitada, o programa IBM SPSS V 17.0 também serviu para investigar eventuais diferenças significativas entre grupos e entre graus dos tumores através da análise de variância (ANOVA) a duas vias com um modelo linear geral, conjugada com testes robustos de igualdade de médias (Welch, Brown-Forsythe). Nas comparações entre pares de médias múltiplas foi considerado o ajustamento de Bonferroni. O teste t para amostras independentes foi utilizado considerando caso a caso as variâncias homogéneas ou heterogéneas. Nas situações em que o interesse recaía sobre eventuais associações entre variáveis categóricas, as tabelas de dupla entrada foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado ou de Fisher, consoante a adequação. Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para algumas das variáveis contínuas. O nível de significância de rejeição foi colocado em $P < 0.05$.

Resultados

Capítulo IV

1. Caracterização da glândula mamária normal - 117
2. Caracterização do modelo experimental - 122
3. Caracterização da termoterapia focal - 135
4. Caracterização da terapia complementar - 144

Capítulo IV

Resultados

1. Caracterização da glândula mamária normal

O grupo I foi constituído por 6 ratos-fêmea virgens da estirpe Sprague-Dawley, com 50 dias de idade. Semanalmente, o registo individual do peso foi efectuado tendo o peso médio sido de 277,876g com um desvio padrão de 3,534g.

O sangue colhido foi avaliado para quantificação de parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica (Tabela 19). Todos os resultados que se seguem estão expressos em média seguida do desvio padrão (DP). Os animais do grupo I obtiveram os seguintes valores de hemograma relacionados com a linha eritrocitária: $6,9 \cdot 10^6$ eritrócitos/ml (DP 0,4963), 13,1g de hemoglobina/dl (DP 0,8), 37,18% de hematócrito (DP 2,2), 53,8 fl (DP 1,3) de VGM, 19,06 pg de HCM (DP 0,53) e 35,34 g/dl de CHCM (DP 0,3). No hemograma e dentro da linha leucocitária obteve-se a contagem de $3,76 \cdot 10^3$ leucócitos/ml (DP 1,34), dentro os quais $0,94 \cdot 10^3$ /ml neutrófilos (DP 0,4), $0,045 \cdot 10^3$ /ml eosinófilos (DP 0,031), $0,012 \cdot 10^3$ /ml basófilos (DP 0,009), $0,098 \cdot 10^3$ /ml monócitos (DP 0,051) e $2,64 \cdot 10^3$ /ml linfócitos (DP 1,00). A contagem média de plaquetas foi de 527800,00/ml (DP 224327,216).

Tabela 19 – Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo I.

Valores de hemograma para o Grupo I				Valores de bioquímica sérica para o Grupo I			
	Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência		Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência
Eritrócitos	6,9120	0,49631	7,16-9,24 10^6 /ml	Glicose	142,20000	16,483325	89-163 mg/dl
Hemoglobina	13,160000	0,8088042	13,7-17,2 g/dl	Colesterol Total	85,40000	18,635987	23-97 mg/dl
Hematócrito	37,18	2,199	38,5-49,2 %	Triglicéridos	205,60000	77,448693	16-175 mg/dl
V. G. Médio	53,80000	1,303840	50,3-57 fl	Ureia	32,80000	3,898718	11,7-25 mg/dl
H. C. Média	19,06000	0,531977	17,6-20,3 pg	Creatinina	0,380000	0,0282843	0,3-0,6 mg/dl
C.H.C.Média	35,34000	0,304959	33,2-37,8 g/dl	Cálcio Total(S)	5,180000	0,2489980	9,5-12,1 mEq/l
Leucócitos	3,76000	1,346477	0,96-7,88 10^3 /ml	Bilirrubina Total	0,182000	0,0109545	0,07-0,21 mg/dl
Fórmula Leucocitária				Bilirrubina directa	0,020000	0,0000000	0,03-0,07 mg/dl
				Bilirrubina indirecta	0,162000	0,0109545	0,02-0,13 mg/dl
Neutrófilos	0,94020	0,402561	0,15-1,11 10^3 /ml	AST	159,500000	29,8942581	64-222 u/l
Eosinófilos	0,045500	0,0313103	0,01-0,14 10^3 /ml	ALT	39,000000	9,4868330	14-64 u/l
Basófilos	0,012800	0,0097314	0-0,02 10^3 /ml	Fosfatase Alcalina	57,000000	15,5134350	18-62 u/l
Monócitos	0,098800	0,0514752	0,01-0,13 10^3 /ml	Proteínas totais	6,898000	0,5212197	5,7-8,3 g/dl
Linfócitos	2,641800	1,0029129	0,68-6,8 10^3 /ml	Albumina	2,402000	0,3151508	3,7-5,8 g/dl
Plaquetas	527800,00	224327,216	599 000 - 1144 000/ml	LDH	1974,800000	866,6462369	256-1552 u/l

Nos parâmetros analisados de bioquímica sérica os resultados médios e de desvio padrão foram: glicose 142,4 mg/dl (DP 16,48), colesterol total 85,4 mg/dl (DP 18,6), triglicéridos 205,6 mg/dl (DP 77,44), ureia 32,8 mg/dl (DP 3,89), creatinina 0,38 mg/dl (DP 0,028), cálcio total 5,18 mEq/l (DP 0,24), bilirrubina total 0,182 mg/dl (DP 0,01) composta por bilirrubina directa 0,02 mg/dl (DP 0,00) e por bilirrubina indirecta 0,16 mg/dl (DP 0,01), AST 159,5 u/l (DP 28,89), ALT 39 u/l (DP 9,49), FA 57 u/l (DP 15,51), proteínas totais 6,9 g/dl (DP 0,52), albumina 2,40 g/dl (DP 0,32) e LDH 1974,8 u/l (DP 866,64).

No exame macroscópico das glândulas mamárias o epitélio glandular trata-se de um tecido nacarado homogéneo e pouco consistente, pelo que é indiferenciável do tecido adiposo envolvente. A glândula mamária inguinal direita, M12, foi colhida e processada para coloração com HE, tricrómico de Masson (TM), azul de toluidina (AT) e imunohistoquímica para o receptor de estrogénio, Ki67, caspase-3, HSP70, CD3 e osteopontina.

Na avaliação microscópica (Figura 54) por HE, a glândula mamária é composta por ácinos e túbulos. Ambos têm duas camadas diferentes de células epiteliais. Nos ácinos camada mais externa é formada por células luminais, por vezes com vacúolos de secreção sem afinidade tintorial, enquanto nos túbulos as células tubulares fazem o revestimento luminal. Morfologicamente estas células são cúbicas e o núcleo é central ou basal de cromatina fina e o citoplasma é ligeiramente acidófilo. Em algumas células luminais observa-se uma pigmentação citoplasmática dourada, positiva ao azul da Prússia (Figura 54, C), pág. 119), e negativa nas colorações de Ziehl Neelsen e PAS. A camada mais interna de células epiteliais assenta na lâmina basal sendo composta por células mais fusiformes denominadas células mioepiteliais [138]. O estroma envolvente é escasso e contendo algumas células redondas como mastócitos e linfócitos.

Na coloração de TM (Figura 54 E), pág. 119) as 6 (100%) glândulas mamárias apresentaram um estroma classificado como moderado (nível 2). Na coloração azul de toluidina, que evidencia os grânulos metacromáticos de mastócitos, a glândula mamária normal tem uma média de 16 mastócitos por campo de 100x.

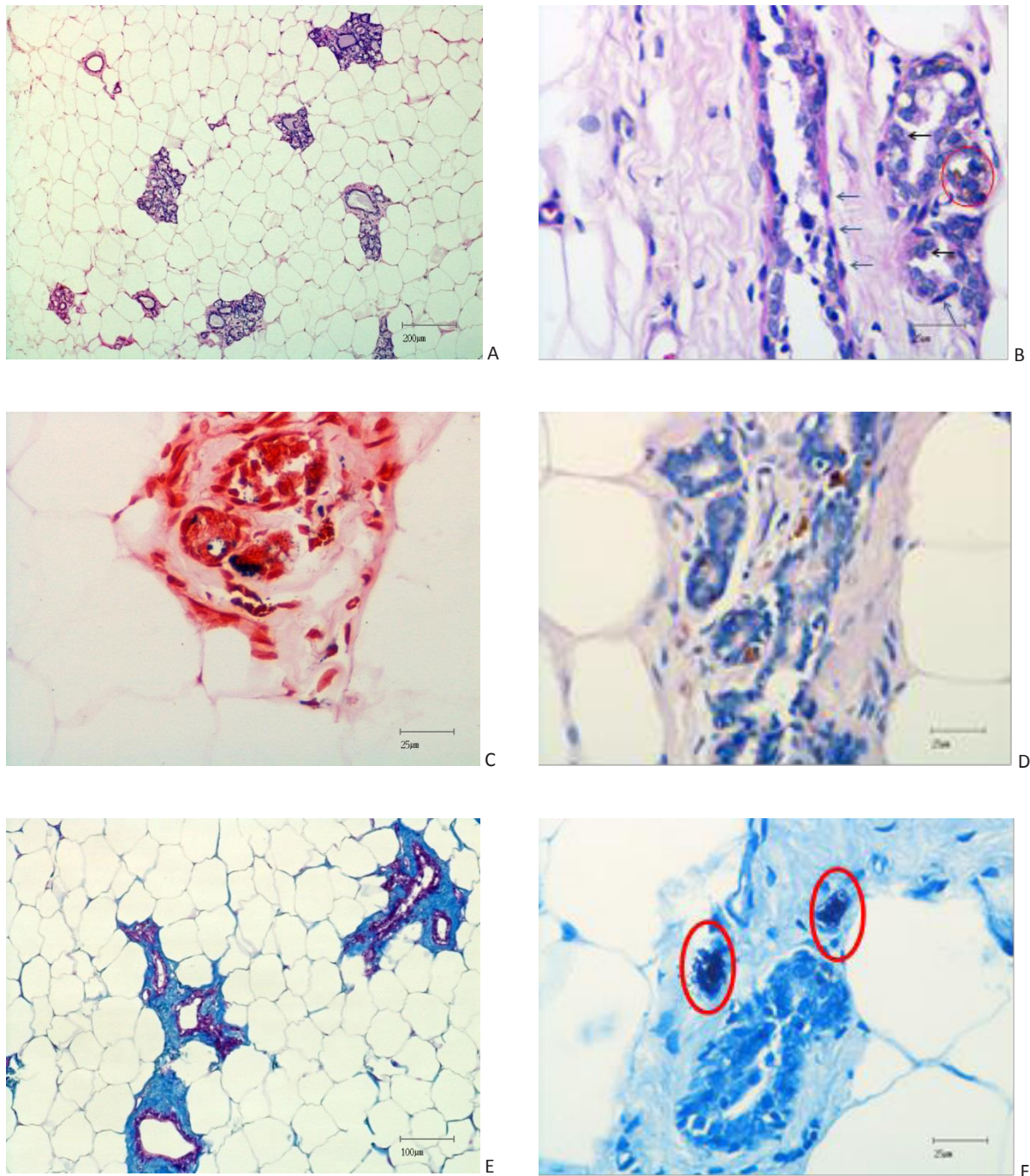


Figura 54 – Imagem histológica da glândula mamária inguinal direita num rato fêmea virgem da estirpe Sprague Dawley com 34 semanas de idade. A) A glândula mamária é formada por estruturas tubuloalveolares dispersas por uma almofada lipídica (HE, 50x). B) As células luminais (seta preta) e as células mioepiteliais (seta azul) formam o parênquima e o estroma é formado por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Há ocorrência de pigmentação dourada (círculo vermelho) no citoplasma de células luminais alveolares (HE, 400x). C) Evidenciação positiva do pigmento dourado pelo corante Azul da prússia (AP), (AP, 400x). D) Evidenciação negativa da pigmentação com Ziehl Neelsen (ZN) (ZN, 400x). E) Coloração selectiva das fibras de colagénio por tricrómico de Masson, (TM, 100x). F) Metacromasia dos grânulos de mastócitos (destaque circular) pela coloração Azul de toluidina (AT), (AT, 400x)

A caracterização por imunohistoquímica da glândula normal do rato (Tabela 20) seguiu o procedimento descrito no capítulo anterior com discriminação da intensidade percentual de imunomarcação e imunomarcação percentual geral, independentemente da localização ser nuclear ou citoplasmática. É de salientar que a intensidade de imunomarcação foi graduada em três níveis. A percentagem total de imunomarcação foi obtida pela soma das percentagens parciais de células marcadas por cada nível de intensidade.

Em média, as seis preparações avaliadas para o receptor de estrogénio, obtiveram uma imunomarcação ligeira, ou de nível 1, em 43,3% (DP 4,08) das células marcadas, a intensidade foi moderada ou de nível 2, em 31,67% (DP 14,02) das células marcadas e foi considerada forte em 5% (DP 8,37) do total de células positivas. No seu conjunto, 80% (DP 15,81) das células glandulares foram positivas para o receptor do estrogénio (Figura 55, A). Para os marcadores Ki67 e caspase 3 a intensidade de imunomarcação foi homogénea e de fraca intensidade com uma média de 2,0% (DP 4,74) para o primeiro marcador, e com intensidade moderada com uma média de 0,4% (DP 0,1) para o segundo anticorpo. A imunomarcação anti-HSP70 nas células basais foi muito expressiva tanto nos alvéolos mamários como nos túbulos (Figura 55, C e D) com uma média de 85% (DP 7,07) em intensidade de nível 2 e, pelo contrário, das células luminais apenas 0,1% foram fracamente positivas. A imunomarcação de linfócitos T no estroma foi mínima enquanto no parênquima obteve uma média de 5% (DP 1,09) com intensidade moderada. A imunomarcação do estroma pelo anticorpo anti-osteopontina foi praticamente nula, registando-se apenas 2 preparações (de 6) com marcação ligeira (Figura 55, B).

Tabela 20 – Caracterização imunohistoquímica da glândula mamária inguinal direita de seis ratos fêmea virgem da estirpe Sprague Dawley com 34 semanas de idade.

Anticorpos para imunomarcação	% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Receptor de Estrogénio	80	15,81	43,33	4,08	31,67	14,02	5,00	8,37	
Ki67	2,0	4,74	2,0	4,74					
Caspase 3	0,4	0,10			0,4	0,10			
HSP 70	Células basais	85	7,07			85	7,07		
	Células luminais	0,1	0,0	0,1	0,0				
CD3	Estroma	0,0	0,0						
	Parênquima	5,0	1,09			5,0	1,09		
Osteopontina (valores absolutos)	Imunomarcação nível 0	Imunomarcação nível 1		Imunomarcação nível 2		Imunomarcação nível 3			
		4	2						

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

Com base nestes resultados indica-se agora a localização celular da imunoreactividade dos anticorpos usados que é válida para os restantes grupos. O receptor de estrogénio tem uma localização exclusivamente nuclear, sendo também essa a distribuição da imunomarcação [55]. A proteína Ki67 está relacionada com a proliferação e tem uma localização nuclear [55]. A caspase 3 é uma proteína que resulta da activação das vias de apoptose, intrínseca e extrínseca [109], tem localização citoplasmática e a imunoreactividade que desencadeia é muito suave e dispersa pelo citoplasma. O anticorpo anti-HSP70 marca sobretudo o núcleo, mas também o citoplasma [409]. Os linfócitos T têm à superfície membranar o marcador de diferenciação CD3, de modo que a imunoreactividade é membranar [410]. A osteopontina é uma proteína do estroma em tecidos com diferenciação óssea, no entanto em neoplasias da glândula mamária também é sintetizada [232, 345], de modo que, o critério de leitura restringiu-se apenas à imunomarcação do estroma.

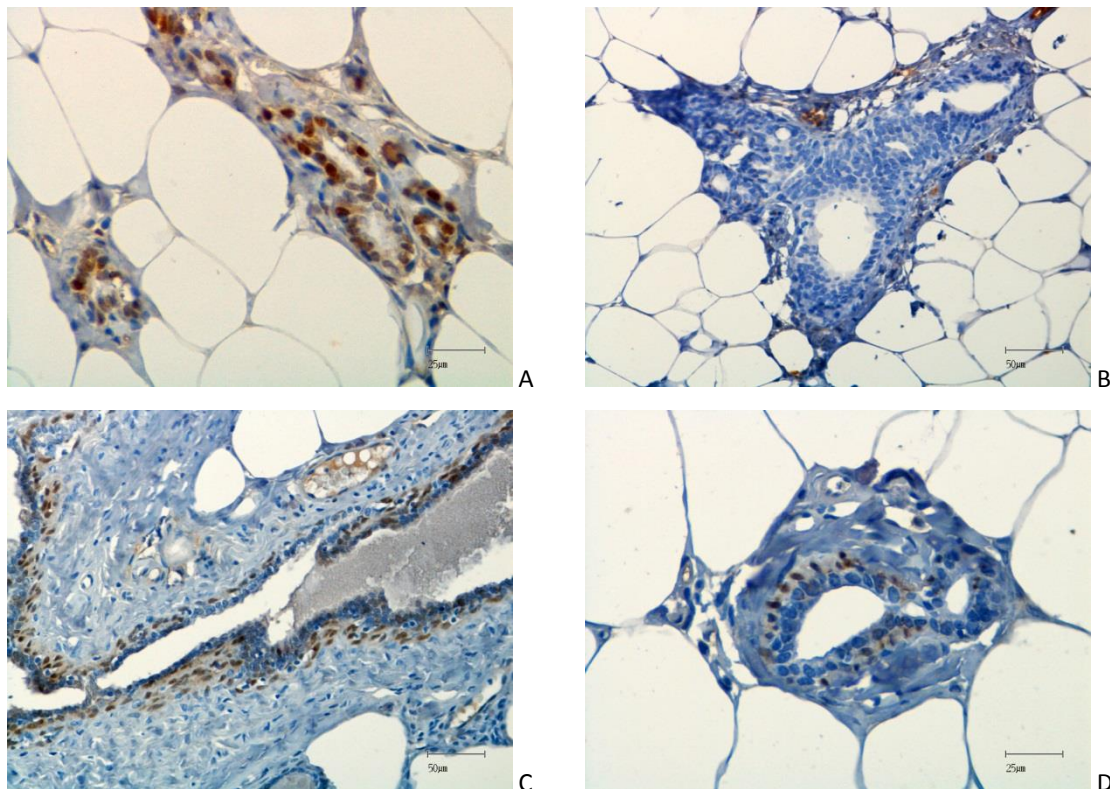


Figura 55 – Caracterização da glândula normal do rato por imunohistoquímica. A) Imunomarcação das células luminiais por estrogénio (400x); B) Imunomarcação pouco expressiva da osteopontina periglandular (200x); C) As células basais dos túbulos são fortemente positivas para HSP70 (200x) assim como em D) as células basais dos alvéolos mamários (400x).

2. Caracterização do modelo experimental

2.1. Taxa de indução, curvas de crescimento e caracterização macroscópica do modelo experimental

A caracterização do modelo experimental de neoplasias da glândula mamária quimicamente induzidas por DMBA incluiu 48 ratos-fêmea virgens, da estirpe Sprague Dawley, com 50 dias de idade, dos quais 36 desenvolveram 148 lesões neoplásicas, com um rendimento de indução de 75% e uma média de 4,1 neoplasias por animal. O peso médio dos animais, entre o início do estudo e o sacrifício, foi de 279,799g (DP 1,486). Por comparação com o grupo I não se verificou a existência de uma diferença estatisticamente significativa. Quando se relacionou o peso semanal com o número e o grau dos tumores, verificou-se que havia uma relação inversa entre o peso dos animais e a existência de pelo menos um tumor de grau III. Para os animais com neoplasias de grau I e II e para aqueles que não desenvolveram neoplasias, não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas quanto ao peso médio. Também o número de tumores influencia o peso, tendo-se encontrado uma relação directa entre estas duas variáveis, quanto mais tumores se desenvolveram mais pesados se tornavam os animais.

O desenvolvimento de neoplasias neste modelo pode ocorrer na cadeia mamária esquerda ou direita desde as glândulas mamárias cervicais às inguinais (Figura 56). 78 neoplasias foram macroscopicamente descritas em detalhe e esses resultados foram correlacionados com o respectivo grau tumoral. Assim, 45,3% dos tumores surgiram na cadeia mamária esquerda e 54,7% na cadeia mamária direita. Relativamente à disposição anatómica cervical-caudal, as glândulas mamárias cervicais foram sede para 38,4% das neoplasias, as primeiras glândulas torácicas de 15,1%, as segundas glândulas mamárias torácicas 14%, as primeiras glândulas abdominais desenvolveram 10,5%, as segundas glândulas abdominais 14% das neoplasias e por fim as inguinais foram sede de 8,1%. Correlacionando o grau com a localização do tumor não se verificaram associações significativas.

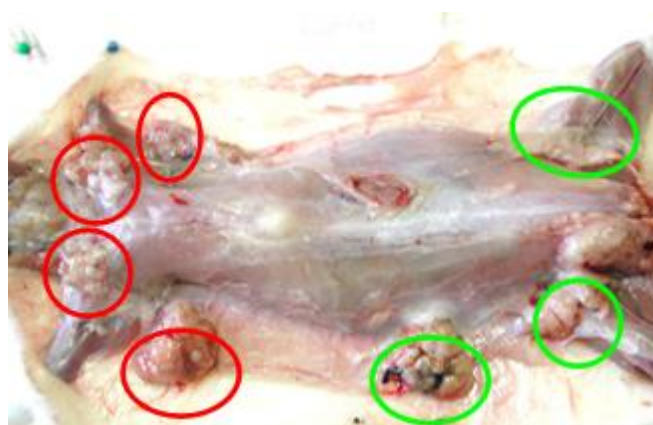


Figura 56 – Proliferações neoplásicas nas glândulas mamárias à 27ª semana após a indução carcinogénica com 65mg/Kg de DMBA. As neoplasias desenvolvem-se nas glândulas mamárias cervicais e torácicas (círculos vermelhos) e nas glândulas mamárias abdominais e inguinais (círculos verdes).

A macroscopia dos tumores avaliou o volume, a textura e a aparência. O volume médio das neoplasias foi de 11828,3440 mm³, com um desvio padrão de 51760,39075 com peso médio de 3,2061g (DP 11,55846). Na correlação entre variáveis, verificou-se que o peso e o volume estão significativamente correlacionados. O grau influencia de forma estatisticamente significativa o volume do tumor, desta forma quanto maior for o grau do tumor maior é o volume.

A forma de 78 tumores foi avaliada e classificada em esferóide, elipsóide, ulcerada, ulcerovegetante ou irregular. Dentro dos 47 tumores de grau I, 34% eram esferóides, 2,1% esferóides e irregulares, 55,3% elipsóides e 8,5% irregulares. Os 24 tumores de grau II tinham forma esferóides em 12,5%, elipsóide em 54,2%, elipsóide e ulcerada em 8,3%, ulcerada em 4,2% e irregular em 20,8%. Dos tumores de grau III, 14,3% eram esferóides, 42,9% elipsóides, 14,3% elipsóides e ulcerados, 14,3% elipsóides e irregulares e 14,3% irregulares. Os testes estatísticos revelaram que quando os tumores tinham uma forma elipsóide com uma componente irregular ou ulcerativa os tumores não eram de grau I, mas sim de grau II ou III.

Quanto à tonalidade dos tumores, os de grau I distribuíram-se do seguinte modo: 61,7% branco acinzentados, 2,1% branco acinzentados com tonalidade rosa, 2,1% branco acinzentados com tonalidade escura, 6,4% brancos, 2,1% cinzentos, 14,9% róseos, 2,1% róseos e amarelos, 2,1% amarelos, 4,3% amarelos e escuros e 2,1% escuros. Os de grau II apresentavam em 45,8% dos casos tonalidade branca acinzentada, 4,2% branca e avermelhada, 8,3% branca, 16,7% cinzenta, 8,3% rósea, 8,3% amarelos, 4,2% vermelho e escuro e 4,2% apenas tonalidade escura. Os 7 tumores de grau III apresentaram uma tonalidade branco acinzentado e amarelo em 28,6%, em 14,3% cinza, 14,3% rósea, 28,6% amarelo e 14,3% escuro. Os testes estatísticos demonstraram que há diferenças estatisticamente significativas quando os tumores são apenas branco-acinzentados, já que são todos de grau I ou grau II. Também a tonalidade amarela reflecte uma diferença com uma percentagem muito superior de prevalência quando os tumores são de grau II ou de grau III.

A consistência também foi classificada em encefalóide, mole, firme, dura-elástica ou pétrea. Dentro desta classificação, os tumores de grau I apresentaram consistência encefalóide em 8,5%, em 42,5% mole, 40,4% firme, 8,6% dura-elástica. Os tumores de grau II tinham em 4,2% uma consistência encefalóide, 41,7% mole, 41,6% firme e 12,5% dura-elástica. Os tumores de grau III apresentaram consistência encefalóide em 6,4%, mole em 37,2%, firme em 44,8% e pétrea em 11,6%. Comparativamente não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a consistência e o grau dos tumores.

A presença ou ausência de cápsula também foi avaliada e a grande maioria dos tumores eram encapsulados não se verificando diferenças entre os tumores quanto ao grau.

Na avaliação da superfície de secção, a maioria dos tumores de grau I (78,7%) e de grau II (58,4%) eram homogêneos em oposição aos tumores de grau III onde 85,7% tinham uma superfície de secção heterogênea. A caracterização da cor da superfície de corte também foi apreciada, mas os testes estatísticos não revelaram tendências entre os diversos graus de tumor.

2.2. Caracterização histopatológica do modelo experimental

A partir da avaliação histopatológica fez-se a determinação do tipo de neoplasia, a identificação dos padrões histológicos presentes (Figura 57), a determinação do grau tumoral pela avaliação do grau nuclear (Figura 58), percentagem de padrão tubular e contagem do número de mitoses, e ainda a avaliação semiquantitativa de características tumorais com relevância para este estudo (Figura 59).

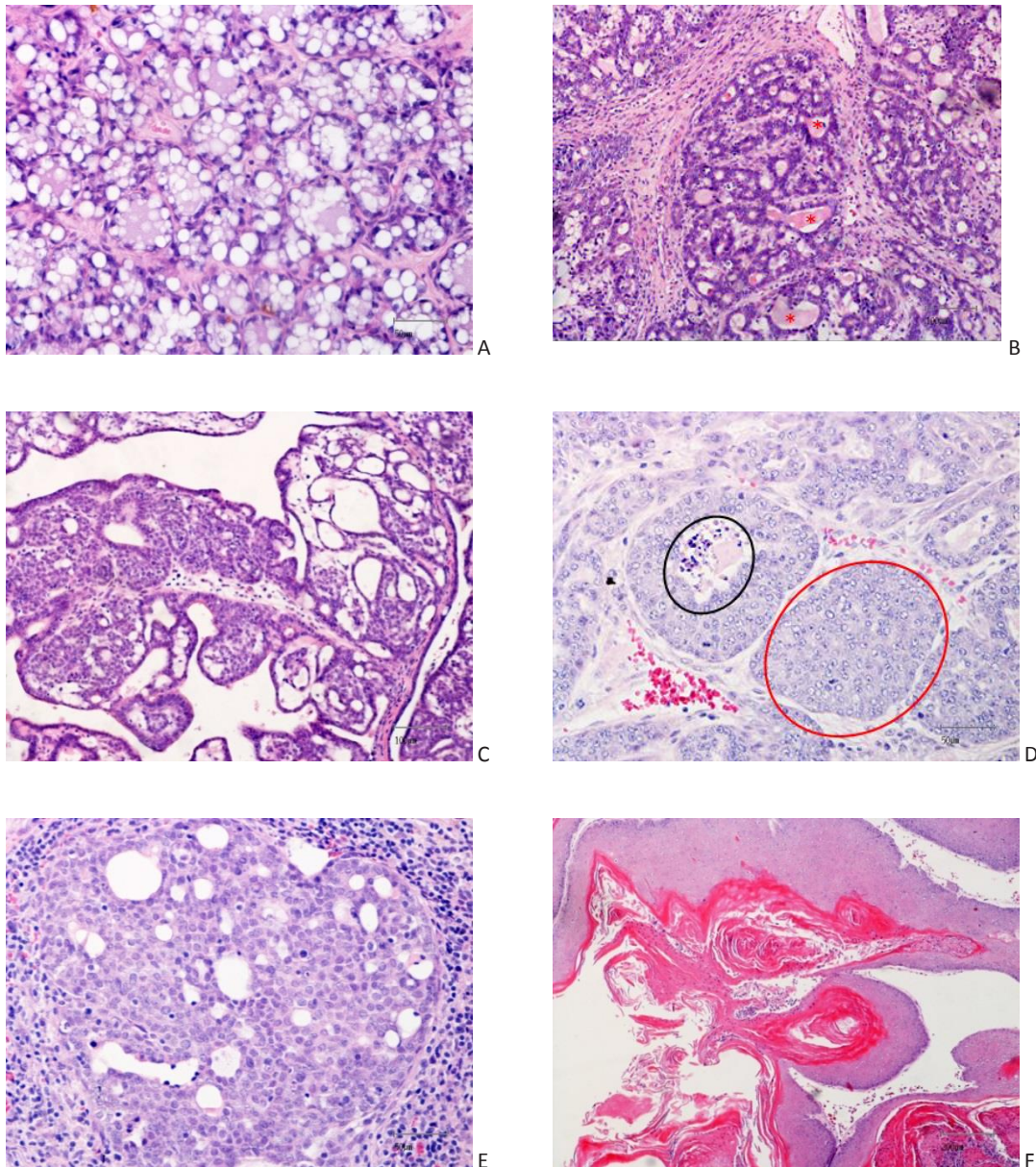


Figura 57 – Fotomicrografias de neoplasias da glândula mamária do grupo II com representação de alguns padrões estruturais presentes nos tumores da glândula mamária de ratos com carcinogênese induzida por DMBA: A) adenoma de lactação com secreção de nível 3 (HE, 200×); B) padrão tubular com secreção (asterisco) de nível 2 (HE, 100×); C) padrão papilar com secreção de nível 1 (HE, 100×); D) padrão sólido (círculo preto) e padrão com necrose numa aparência de comedocarcinoma (círculo vermelho), com secreção de nível 0 (HE, 200×); E) padrão cribriforme envolvido por estroma infiltrado por células inflamatórias de nível 2 (HE, 200×); e F) padrão espinocelular com formação de queratina, ortoplásico (HE, 40×).

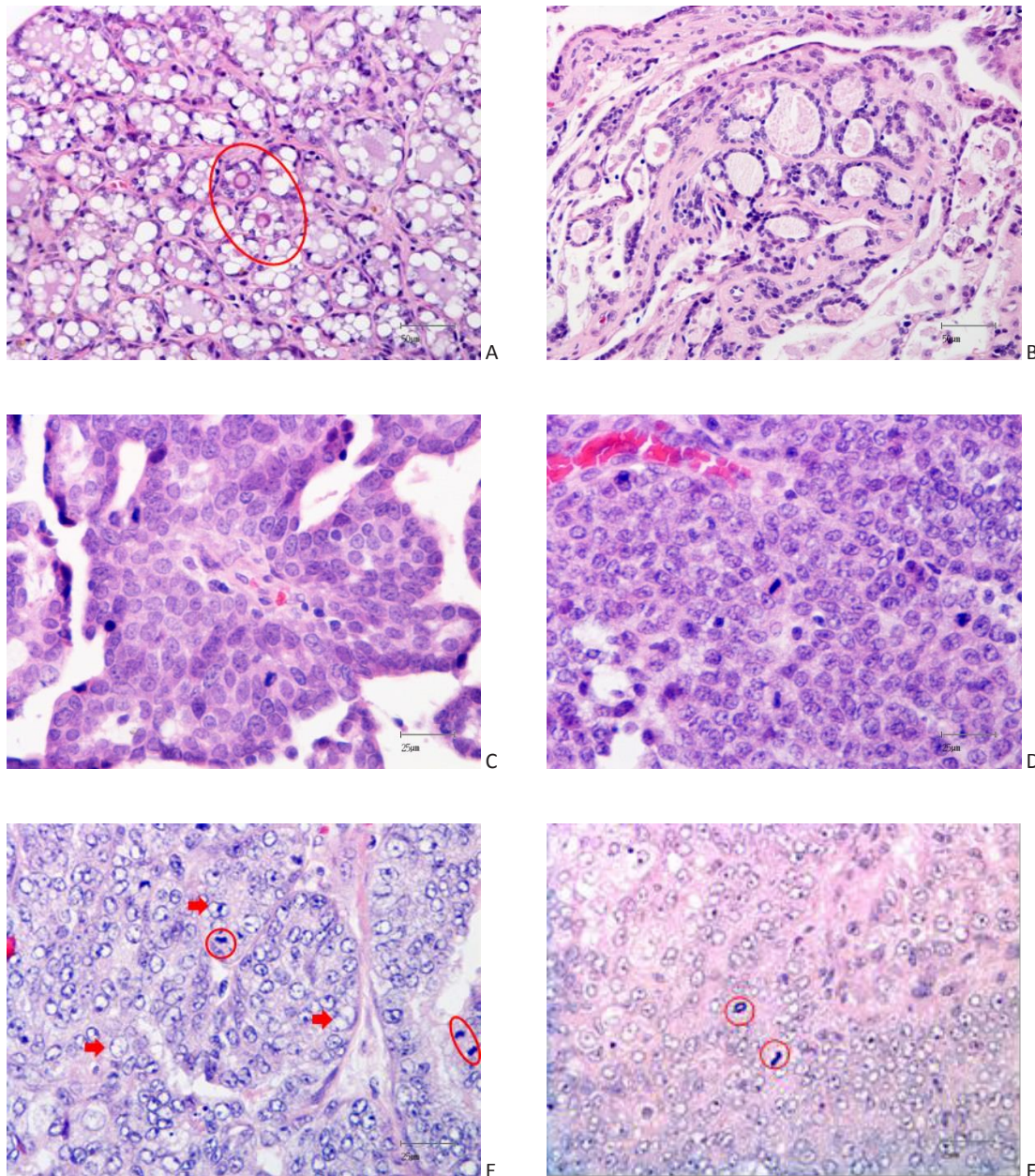


Figura 58 – Fotomicrografias de neoplasias de glândula mamária do grupo II com células neoplásicas onde os núcleos podem ser classificados como I, II ou III. A) Grau nuclear I, notar a disposição basal dos núcleos e a regularidade do tamanho, forma e padrão de cromatina das células epiteliais de um adenoma de lactação. Dois corpos amiláceos estão assinalados com um círculo (HE, 200x); B) grau nuclear I, notar a homogeneidade entre as células epiteliais que formam ductos e alvéolos neste carcinoma tubular muito semelhantes com as células epiteliais não neoplásicas da glândula mamária (HE, 100x); C) grau nuclear II, observar alguma homogeneidade nuclear em tamanho e padrão de cromatina, apesar do pleomorfismo moderado quanto à forma dos núcleos que variam de redondos a ovais (HE, 400x); D) grau nuclear II, os núcleos das células neoplásicas conservam uma relativa homogeneidade quanto à forma e tamanho, apesar de serem constituídos por cromatina de padrão reticular (HE, 400x); E) grau nuclear III, os núcleos apresentam um pleomorfismo acentuado e vesículas intranucleares (setas), notar ainda figuras de mitose em metafase (círculo) e anafase (forma oval) (HE, 400x); F) duas mitoses assimétricas, ditas aberrantes, numa população celular com grau nuclear III (HE, 400x).

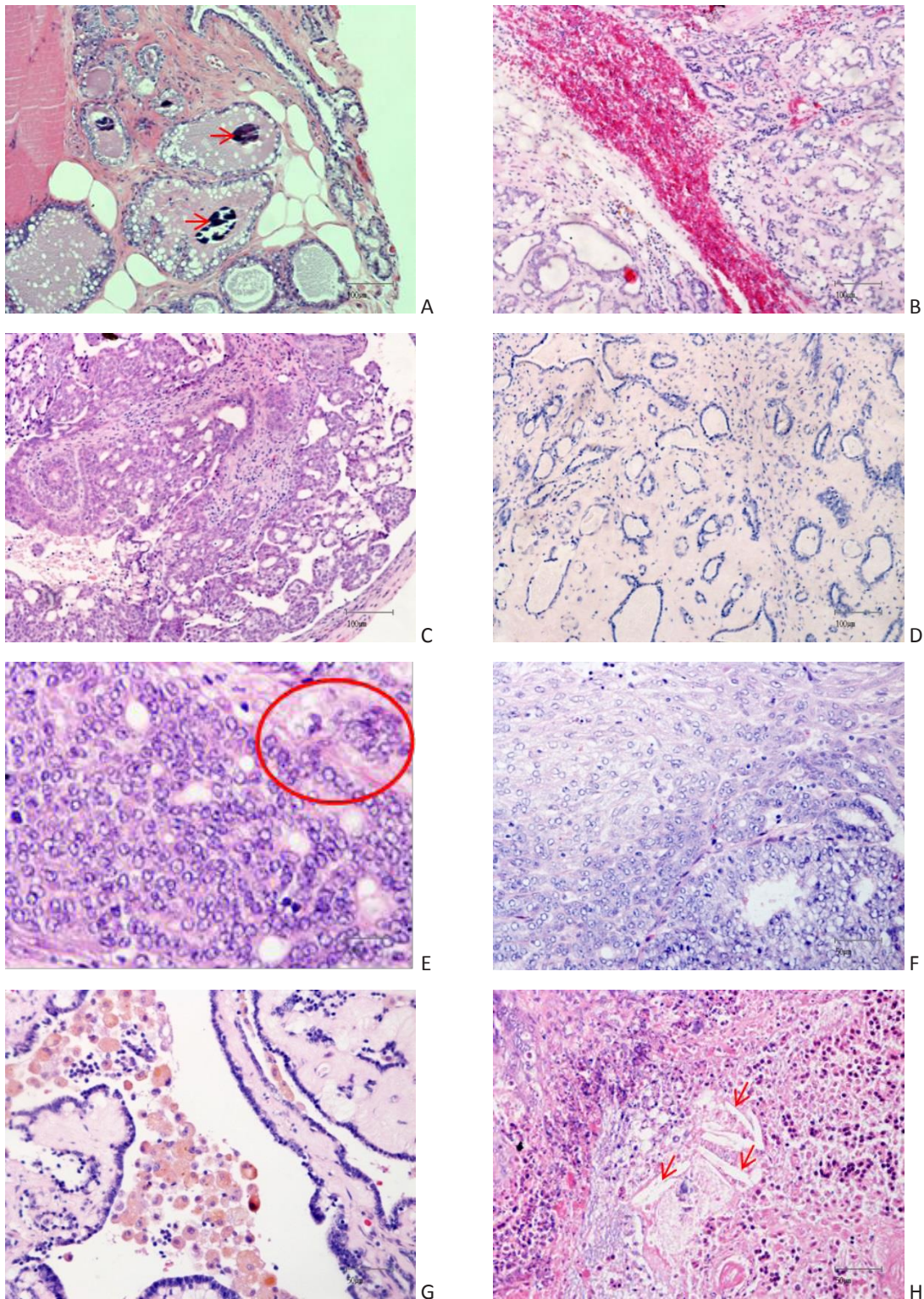


Figura 59 – Fotomicrografias de neoplasias da glândula mamária do grupo II onde se observam algumas características avaliadas por semiquantificação. A) Focos de microcalcificação intraluminal (setas) (HE, 100x). B) Infiltração tumoral por eritrócitos extravasculares, hemorragia de nível 3 (HE, 100x). C) Adenocarcinoma papilar com desmoplasia de nível 2 (HE, 100x). D) Adenocarcinoma tubular com desmoplasia de nível 3 (HE, 100x). E) Invasão do estroma peritumoral por um grupo de células neoplásicas (HE, 400x). F) Invasão do estroma peritumoral por células neoplásicas individualizadas (HE, 200x). G) Células individualizadas em anóxia com pigmentação intracitoplasmática dourada e acastanhada compatível com ferro e ceróide, respectivamente (HE, 200x). H) Necrose tumoral de nível 3 com fendas de colesterol (setas) (HE, 200x).

Na Tabela 21 encontram-se os valores, expressos em percentagem de tumores, referentes à semiquantificação de características relevantes para a malignidade. Numa perspectiva global, a maioria (93,2%) das neoplasias da glândula mamária obtidas neste modelo experimental tem características malignas com invasão do estroma envolvente, embora numa fase muito inicial. Os tumores foram graduados em I, II e III pelo método *Nottingham Grading System* e obtiveram-se 70 (47,3%) tumores de grau I, 60 (40,5%) de grau II e 18 (12,2%) de grau III. Todos os tumores benignos foram de grau I. Nesta análise todas as variáveis são discretas. Quanto à composição dos tumores, verificou-se que apenas 31,1% apresentava um único padrão histopatológico estrutural, e que a maioria era de grau tumoral baixo, enquanto a maioria dos tumores com 4 ou 5 padrões era de grau tumoral elevado. A heterogeneidade da composição do parênquima neoplásico foi marcada pela presença concomitante das mais diversas combinações entre os padrões histológicos com diferentes prevalências em cada tumor. Uma atenção especial foi dada ao padrão cribriforme e verificou-se que cerca de metade dos tumores eram compostos por este padrão em metade ou mais da sua estrutura, sendo que os de grau tumoral mais elevado o tinham em maior abundância. As microcalcificações foram relativamente escassas (12,2%), e estavam presentes em tumores de todos os graus.

A intensidade de necrose e de hemorragia tendem a ser mais preponderantes nos tumores de maior grau. Já a ausência de necrose verifica-se maioritariamente em tumores de grau I. Em todos os tumores de grau III foram observadas células inflamatórias, geralmente linfócitos e eosinófilos em intensidades variáveis. A secreção glandular tende a estar distribuída pelos tumores de todos os graus. A reação do estroma tende a ser mínima ou moderada em todos os graus tumorais, mas todos os tumores de grau III têm uma presença reactiva de colagénio.

Na publicação de Lopes et al., 2014, [390] estes dados foram analisados por PCA no sentido de melhorar o método NGS e revelar tendências de significância das características histopatológicas avaliadas, visando uma caracterização melhorada dos tumores quando são constituídos por um determinado padrão histológico pertencentes ou não ao mesmo grau tumoral. Os detalhes da metodologia constam dessa publicação, mas sumariamente, a amplitude de variação explicada por cada componente principal é medida por autovalores (*eigenvalues*) e é maior para a primeira CP, sendo progressivamente menores para as CPs subsequentes. O critério para reter uma CP passa por que tenha um autovalor superior a uma unidade, o que indica que a CP correspondente participa com mais variação do que a média, após standardização das variáveis iniciais. A Tabela 22 contém os resultados da análise PCA, por aplicação da matriz de correlação. As duas primeiras CPs e a terceira CP recuperam 43% e 53%, respectivamente, da variabilidade dos dados, indicando que a representação gráfica dos tumores baseada nestas duas ou três componentes é claramente significativa. A Tabela 23 apresenta a relevância de cada parâmetro nas duas primeiras componentes (CP₁ e CP₂).

Tabela 21 - Tabela de frequência percentual da semiquantificação das características tumorais relevantes para a caracterização tumoral, em função do grau tumoral obtido pelo método NGS em microscopia de luz. Os 148 tumores colhidos e analisados constituem a totalidade (100%).

	Níveis	N ^b %	Grau I (70) %	Grau 2 (60) (%)	Grau 3 (18) (%)
Tipo de tumor ^a	1	4,10	8,60	0,00	0,00
	2	2,70	5,70	0,00	0,00
	3	93,2	85,7	100	100
Nº de Padrões histológicos (NPAD)	1	31,1	37,1	26,7	22,2
	2	47,3	45,7	50,0	44,4
	3	19,6	17,1	20,0	27,8
	4	0,86	0,00	1,67	0,00
	5	1,35	0,00	1,67	5,56
Predominância do padrão cribriforme (PCRI) ^c	1	44,6	68,6	26,7	11,1
	2	33,1	24,3	43,3	33,3
	3	22,3	7,14	30,0	55,6
Microcalcificações (MIC) ^d	0	87,8	85,7	88,3	94,4
	1	12,2	14,3	11,7	5,56
Necrose (NEC) ^e	0	24,3	40,0	11,7	5,56
	1	34,5	40,0	28,3	33,3
	2	37,2	17,1	53,3	61,1
	3	4,05	2,86	6,67	0,00
Hemorragia (HEM) ^e	0	37,2	57,1	23,3	5,56
	1	47,3	38,6	55,0	55,6
	2	14,9	4,29	20,0	38,9
	3	0,68	0,00	1,67	0,00
Infiltração de células inflamatórias (INF) ^e	0	8,78	15,7	3,33	0,00
	1	50,7	52,9	50,0	44,4
	2	35,8	27,1	41,7	50,0
Secreção glandular (SEC) ^e	3	4,73	4,29	5,00	5,56
	0	32,4	34,3	30,0	33,3
	1	43,2	37,1	46,7	55,6
	2	18,2	21,4	18,3	5,56
Reacção do estroma (REST) ^e	3	6,08	7,14	5,00	5,56
	0	2,70	2,86	3,33	0,00
	1	44,6	44,3	45,0	44,4
	2	43,2	38,6	45,0	55,6
	3	9,46	14,3	6,67	0,00

^a Benigno (1), maligno *in situ* (2), e maligno invasivo (3).
^b Percentagem de tumores com a ocorrência.
^c Predominância de padrão cribriforme: 0–30% (1), 40–60% (2) e 70–100% (3).
^d Ausente (0) e presente (1).
^e Ausente (0), ligeiro (1), moderado (2) e intenso (3).

Tabela 22 – Autovalores e evolução da recuperação de dados relativos ao número de componentes principais para o conjunto original de dados, composto por 148 neoplasias da glândula mamária.

Componentes principais	Autovalores (λ_i)	Variância explicada (%)	Variância explicada cumulativa (%)
PC ₁	4,21	30,1	30,1
PC ₂	1,76	12,6	42,7
PC ₃	1,51	10,8	53,4
PC ₄	1,12	8,00	61,5
PC ₅	0,88	6,30	67,7
PC ₆	0,82	5,88	73,6
PC ₇	0,79	5,63	79,3
PC ₈	0,66	4,69	83,9
PC ₉	0,56	4,03	88,0
PC ₁₀	0,54	3,87	91,9
PC ₁₁	0,41	2,91	94,8
PC ₁₂	0,38	2,73	97,5
PC ₁₃	0,27	1,90	99,4
PC ₁₄	0,09	0,62	100

Tabela 23 – Contribuição dos parâmetros histológicos para as duas primeiras componentes principais (CP₁ e CP₂). As contribuições mais relevantes estão destacadas a azul.

	CP ₁	CP ₂
NPAD	0,194	-0,305
PCRI	0,312	0,022
MIC	-0,062	-0,464
IEST	0,282	0,231
NEC	0,320	-0,152
HEM	0,335	-0,107
INF	0,255	-0,161
SEC	-0,026	-0,606
ATUB	0,322	0,059
GNUC	0,352	0,170
NMIT	0,327	-0,141
GRA	0,399	0,008
REST	0,051	0,161
APO	0,067	0,364

A primeira componente retém principalmente informação acerca do grau do tumor (GRA), do grau nuclear (GNUC), hemorragia (HEM), número de mitoses (NMIT), áreas tubulares (ATUB), necrose (NEC), predominância do padrão cribriforme (PCRI) e invasão do estroma (IEST). Os coeficientes de correlação indicam que as variáveis estão relacionadas, sendo a maior correlação (0,74) entre o grau tumoral (GRA) e o número de mitoses (NMIT), pelo facto do NMIT ser um factor usado para definir o grau. A correlação menor (0,51) ocorre entre o grau nuclear e a invasão do estroma. Valores elevados destas características sugerem um aumento da malignidade e todos os valores da CP1 são todos positivos sugerindo esta associação

A segunda componente é composta principalmente pela secreção glandular (SEC), microcalcificação (MIC), apoptose (APO) e número de padrões histológicos (NPAD). A maior correlação ocorre entre a secreção e a microcalcificação, mas ainda com um baixo valor (0,32).

Em suma, a primeira componente é entendida enquanto medida de malignidade, reflectindo a discriminação entre a graduação tumoral (inter-grau) e a segunda componente reflecte a direcção através da qual se discriminam os tumores dentro do mesmo grau (intra-grau). A distribuição de cada tumor em ambas as direcções depende do valor de cada parâmetro de maior contribuição para as componentes inter e intra-grau, GRA e SEC, respectivamente. A Figura 60 representa, com base em histogramas, a projecção das componentes entre os graus tumorais. A discriminação ocorre claramente ao longo da componente, apesar da sobreposição entre os graus tumorais 1, 2 e 3. As áreas de sobreposição correspondem a áreas de transição entre os graus tumorais o que significa que, os casos aí incluídos, têm uma tendência maior para evoluir em direcção à malignidade.

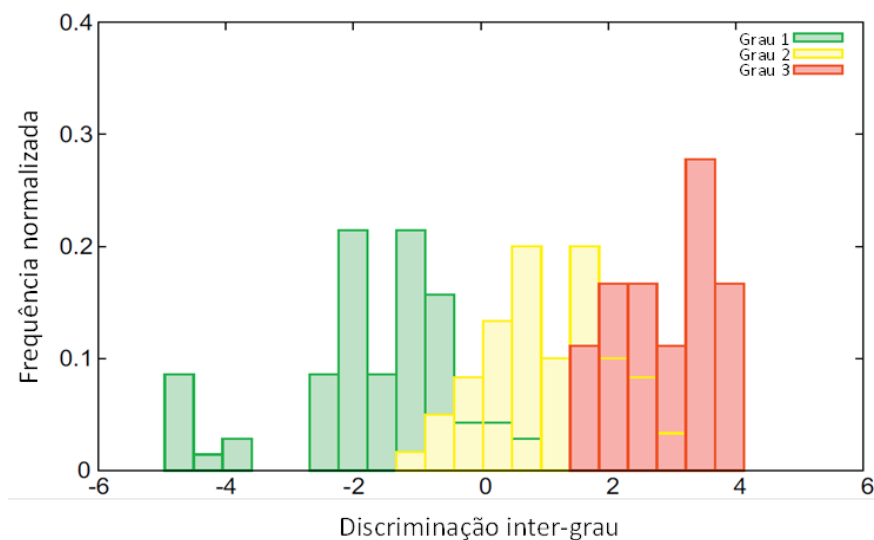


Figura 60 – Histogramas de frequência normalizada para a projecção de tumores de acordo com o grau tumoral. Os histogramas a verde referem-se aos tumores de grau 1, a amarelo e vermelho correspondem os de grau 2 e 3, respectivamente.

De forma a caracterizar a análise da discriminação inter e intra-grau, a análise prossegue separadamente para cada padrão estrutural das neoplasias. Na Tabela 24 estão indicadas as características com relevância para a malignidade onde se verificaram correlações significativas para a discriminação dos tumores com o mesmo grau tumoral e de graus diferentes. A necrose e a hemorragia são pertinentes para distinguir o potencial maligno entre os tumores com a mesma graduação, em especial se forem constituídos pelos padrões tubular ou comedo. A avaliação semiquantitativa da secreção é um factor benigno responsável essencialmente pela discriminação de tumores do mesmo grau constituídos pelos padrões papilar e escamoso, enquanto o número de mitoses é o único factor de discriminação entre tumores com padrão cribriforme. Na discriminação de tumores entre os vários graus e, para além dos parâmetros que compõem o cálculo desse mesmo grau, a necrose e a hemorragia também são factores de discriminação inter-grau.

Tabela 24 – Parâmetros responsáveis pela discriminação de tumores com o mesmo grau e com grau diferente

Padrão	Grau tumoral semelhante	Grau tumoral diferente
Adenomas	SEC, MIC	-
Papilar	SEC	ATUB, NEC
Tubular	NEC, HEM	NMIT
Cribriforme	NMIT	NMIT, NEC
Escamoso	SEC, MIC	NEC, HEM, APO
Comedo	NEC, HEM	NMIT

2.3. Caracterização do modelo experimental por histoquímica: tricrómico de Masson e azul de toluidina

A semiquantificação do estroma e da quantidade de mastócitos presentes nos tumores foi avaliada pelas colorações tricrómico de Masson e azul de toluidina, respectivamente (Figura 61). Na coloração de TM, 22 neoplasias da glândula mamária (13 de grau I, 6 de grau II e 3 de grau III) foram avaliadas e o resultado foi o seguinte: 9 (40,9%) neoplasias tinham um estroma classificado como residual, ou de nível 1, 11 (50%) neoplasias apresentavam um estroma moderado, ou de nível 2 e duas (9,1%) neoplasias tinham tecido conjuntivo muito abundante, ou de nível 3. Relativamente aos mastócitos contou-se uma média de 46,94 mastócitos/campo (DP 26,03) num total de 10 campos com ampliação de 100x o que, pela análise comparativa com o grupo I, se verificou ser uma elevação estatisticamente significativa.

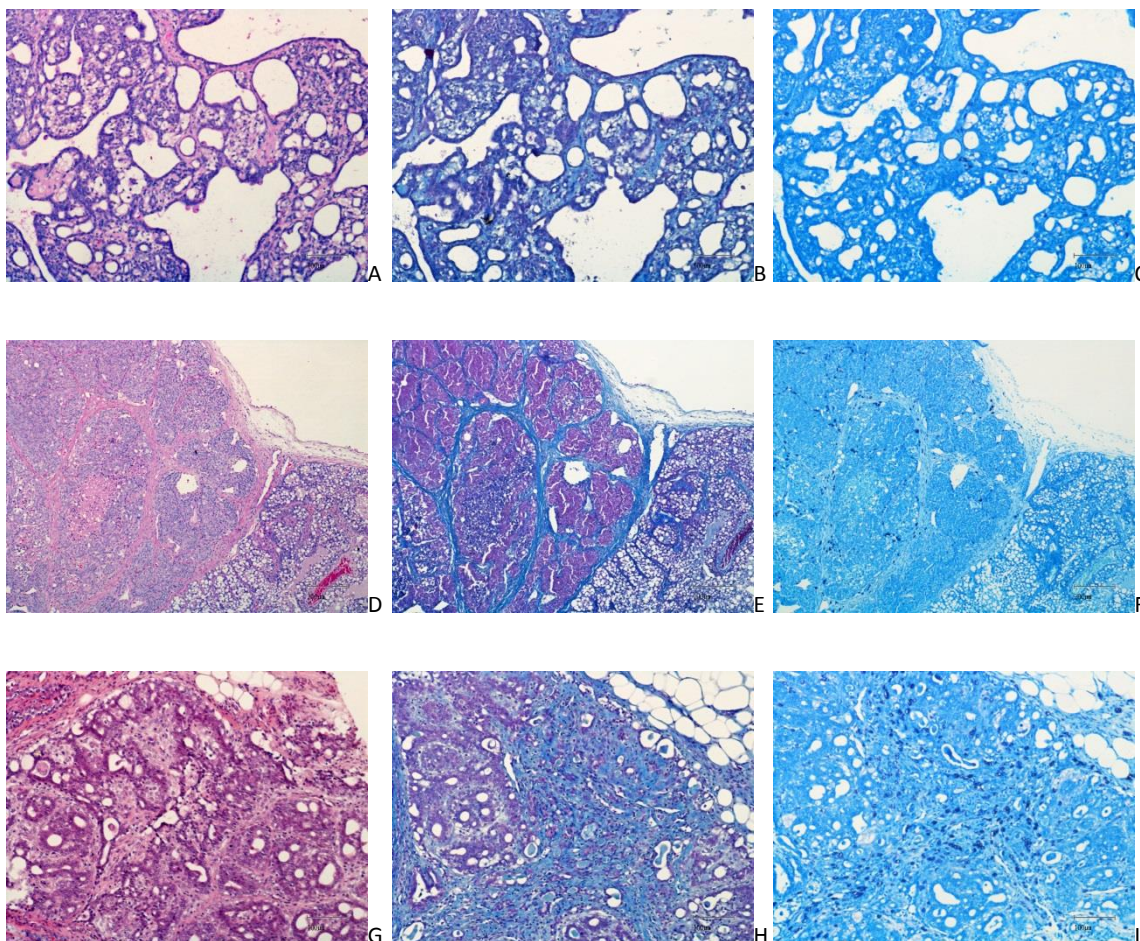


Figura 61 – O tecido conjuntivo nas neoplasias da glândula mamária de rato induzidas por DMBA. A intensidade de tecido conjuntivo é variada e heterogénea. A) Adenocarcinoma papilar e cribriforme com escasso tecido conjuntivo (HE, 100x); B) coloração selectiva com TM para tecido conjuntivo, semiquantificado em nível 1 (TM, 100x); (C) Ainda no mesmo tumor, verifica-se uma infiltração de mastócitos (AT, 100x). D) Comedocarcinoma com estroma formado por tecido conjuntivo em quantidade moderada (HE, 50x); E) tecido conjuntivo evidenciado com TM e semiquantificado em nível 2 (TM, 50x); F) comedocarcinoma com infiltração de mastócitos (AT, 50x). G) Adenocarcinoma cribriforme e tubular com intensa quantidade de tecido conjuntivo (HE, 100x); H) tecido conjuntivo evidenciado com TM e semiquantificado em nível 3 (TM, 100 x); I) tecido conjuntivo com infiltração de mastócitos (AT, 100x).

2.4. Caracterização do modelo experimental por imunohistoquímica

A caracterização por imunohistoquímica (Tabela 25, pág. 132) foi efectuada em 14 neoplasias mamárias de rato às 27 semanas do período experimental, tendo sido quimicamente induzidas aos 50 dias de idade por DMBA (65 mg/kg). Os tumores analisados por imunohistoquímica foram classificados em grau I em 6 neoplasias, grau II em 5 neoplasias e grau III em três neoplasias. Resumidamente, os resultados de imunomarcação para o receptor de estrogénio (Figura 62, A) foi de 62,5% (DP 18,054) das células neoplásicas, das quais 22,85% (DP 16,49) teve intensidade de imunomarcação ligeira, ou de nível 1, em 34,29% (DP 18,38) observou-se intensidade moderada, ou de nível 2, e em 5,36% (DP 3,08) a intensidade de imunomarcação foi forte, ou de nível 3.

A proliferação celular foi identificada pelo anticorpo anti-Ki67 (Figura 62, B) em 9,4% (DP 3,65) das células, sendo 8,5% (DP 3,15) e 0,92% (DP 1,51) de intensidade 2. A imunomarcação de apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 (Figura 62, C) revelou que 4,45% (DP 4,96) das células foram positivas, das quais, 1,09% (DP 4,0) marcaram com intensidade ligeira e 3,36% (DP 3,098) marcaram com intensidade moderada.

O resultado das células com positividade para HSP70 (Figura 62, D), nas células basais, foi de 1,86% (DP 2,41), das quais 1,14% (DP 2,035) tinham imunomarcação ligeira e 0,71% (DP 1,89) marcaram com intensidade moderada. A percentagem de células luminais marcadas pelo mesmo anticorpo foi de 42,1% (DP 16,8) com intensidade ligeira em 32,14% (DP 12,9), intensidade moderada em 2,85% (DP 4,88) e intensidade forte em 7,14% (18,9).

A imunomarcação de linfócitos T no estroma pelo anticorpo anti-CD3 (Figura 62, E) foi de 29,9% (DP 23,47) e de linfócitos T no parênquima (Figura 62, F) foi de 5,79% (DP 3,02), em ambos os casos com intensidade moderada.

Na imunomarcação para osteopontina 7 (50%) preparações marcaram com intensidade ligeira (Figura 62, G) e 7 (50%) preparações com intensidade moderada (Figura 62, H).

Tabela 25 – Caracterização imunohistoquímica de 14 neoplasias da glândula mamária de rato fêmea virgem da estirpe Sprague Dawley com 34 semanas de idade, induzidas por DMBA aos 50 dias de idade, sendo 6 neoplasias de grau I, 5 neoplasias de grau II e três neoplasias de grau III.

Anticorpos para imunomarcação		% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Receptor de Estrogénio		62,5000	18,0544	22,8571	16,49176	34,2857	18,38239	5,3571	3,07864
Ki67		9,4167	3,65459	8,5000	3,14787	0,9167	1,50504		
Caspase 3		4,4500	4,96414	1,0929	4,00355	3,3571	3,09732		
HSP 70	Células basais	1,8571	2,4103	1,1429	2,03540	0,7143	1,88982		
	Células luminais	42,1429	16,79711	32,1429	12,86375	2,8571	4,87950	7,1429	18,89822
CD3	Estroma	29,8571	23,47456			29,8571	23,47456		
	Parênquima	5,7857	3,01735			5,7857	3,01735		
Osteopontina (valores absolutos)		Imunomarcação nível 0		Imunomarcação nível 1		Imunomarcação nível 2		Imunomarcação nível 3	
				7		7			

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

Os testes estatísticos de comparação entre os grupos I e II permitem verificar que as células neoplásicas, em comparação com as células da glândula mamária normal, são menos hormonodependentes do estrogénio e têm maior índice proliferativo. Também nas neoplasias, a apoptose é mais frequente e com intensidade moderada ao passo que a HSP 70 está mais presente nas células luminais com intensidade ligeira, mas muito menos presentes nas células basais. Os linfócitos T não apresentam diferenças estatisticamente significativas nas células parenquimatosas, mas em oposição, são mais frequentes no estroma tumoral do que na glândula normal. Por último a osteopontina é mais prevalente nos tumores mamários do que na glândula mamária normal.

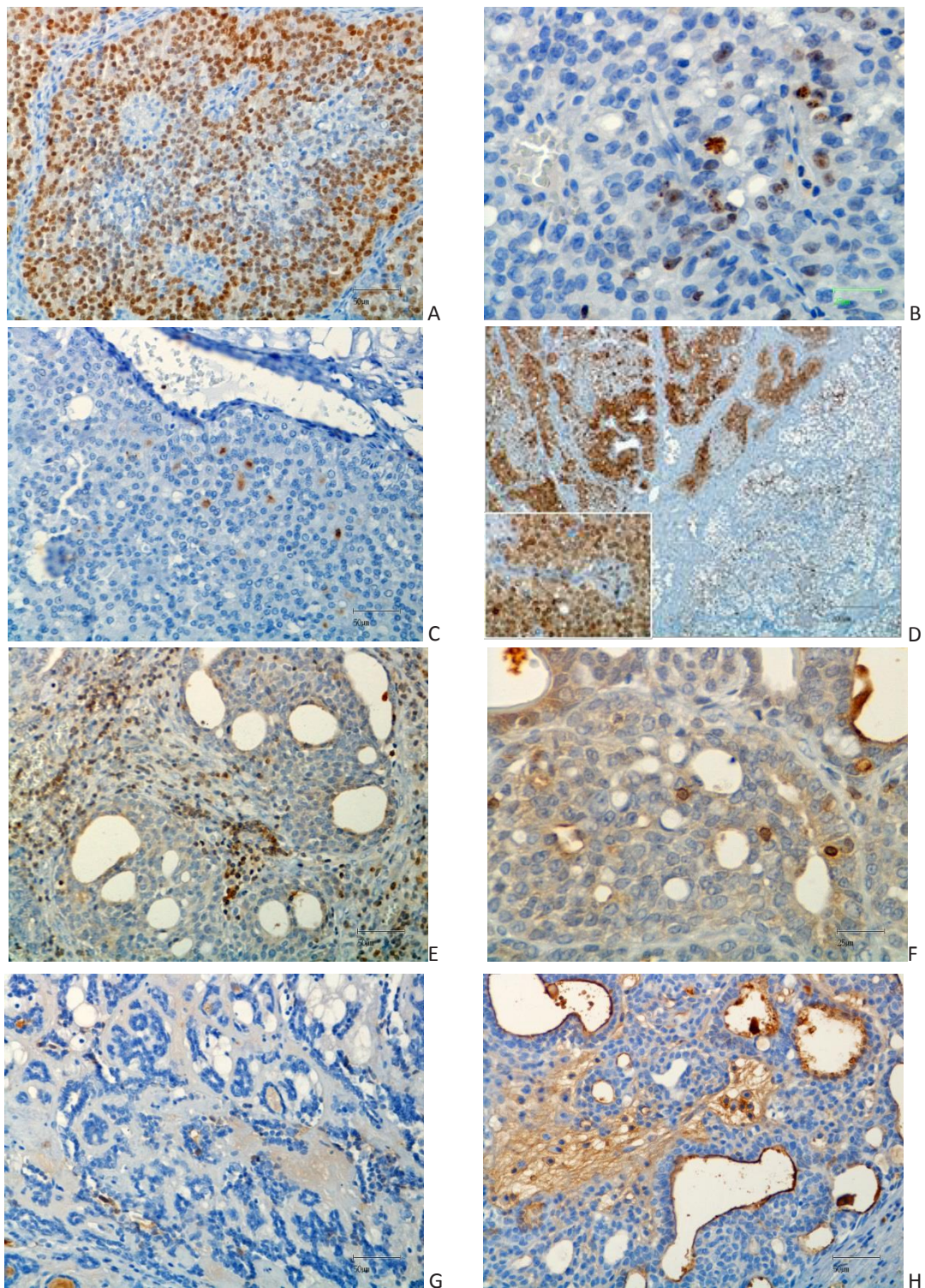


Figura 62 – Imunomarcção neoplasias mamárias induzidas por DMBA. A) Adenocarcinoma sólido com forte positividade ao receptor de estrogénio, (200x). B) Carcinoma sólido com células imunomarcadas por anticorpo anti-Ki67, (400x). C) Identificação de células em apoptose por imunomarcção de caspase 3, (200x), D) Adenocarcinoma sólido muito heterogéneo na imunomarcção pelo anticorpo anti-HSP70, (50x) e pormenor das células parenquimatosas positivas, (400x). E) e F) Evidenciação de linfócitos T, CD3+, presentes no estroma e no parênquima, respectivamente, (400x e 200x). G) e H) Imunomarcção de osteopontina com intensidade 1 e intensidade 2, respectivamente, (200x).

3. Caracterização da termoterapia focal

3.1. Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da inoculação de cimento em animais sem indução neoplásica

A caracterização da termoterapia focal em animais com neoplasia compreende a inoculação de cimento no tumor seguido do tratamento hipertérmico. Para avaliar os efeitos locais e sistêmicos deste biomaterial em animais sem neoplasias mamárias, constituiu-se um grupo formado por 6 animais, grupo III. Nestes animais, à 26ª semana da experiência, a glândula mamária inguinal direita foi inoculada com 1,00g de cimento. Os animais foram sacrificados uma semana depois.

O impacto sistémico do cimento foi avaliado de forma objectiva através do peso e dos resultados das análises laboratoriais. Todos os valores relativos à pesagem semanal foram considerados e o peso médio destes animais foi de 282,945g (DP 3,534). Pela análise estatística comparativa com o grupo I não se verificou uma diferença significativa entre os pesos dos animais dos dois grupos.

O sangue colhido foi avaliado para quantificação de parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica (Tabela 26). Todos os resultados que se seguem estão expressos nos parâmetros estatísticos de média, seguida do desvio padrão (DP). Os animais do grupo III obtiveram os seguintes valores de hemograma relacionados com a linha eritrocitária: $6,9 \cdot 10^6$ eritrócitos/ml (DP 0,47), 13,2g de hemoglobina/dl (DP 0,9), 37,75% de hematócrito (DP 2,1), VGM 54,55fl (DP 1,46), HCM 19,21pg (DP 0,6) e CHCM 35,21g/dl (DP 0,66). No hemograma e dentro da linha leucocitária obteve-se a contagem de $7,93333 \cdot 10^3$ leucócitos/ml (DP 2,96), dentro os quais $1,68533 \cdot 10^3$ neutrófilos (DP 0,65), $0,04 \cdot 10^3$ /ml eosinófilos (DP 0,015), $0,009 \cdot 10^3$ /ml basófilos (DP 0,012), $0,14 \cdot 10^3$ /ml monócitos (DP 0,065) e $6,06 \cdot 10^3$ /ml linfócitos (DP 2,42). A contagem média de plaquetas foi de 814000,00/ml (DP 50675,438). Nos parâmetros analisados de bioquímica sérica os resultados médios e de desvio padrão foram: glicose 143,67mg/dl (DP 27,12), colesterol total 79,0 mg/dl (DP 24,7), triglicéridos 152,83 mg/dl (DP 72,49), ureia 31,5mg/dl (DP 4,23), creatinina 0,35 mg/dl (DP 0,055), cálcio total 4,62 mEq/l (DP 0,12), bilirrubina total 0,197 mg/dl (DP 0,015) composta por 0,020 mg/dl de bilirrubina directa (DP 0,0054) e por 0,17 mg/dl de bilirrubina indirecta (DP 0,011), AST 155,83 u/l (DP 26,19), ALT 34,17 u/l (DP 6,15), FA 39,67 u/l (DP 8,62), proteínas totais 6,39 g/dl (DP 0,61), albumina 2,28 g/dl (DP 0,26) e LDH 2074,67 u/l (DP 270, 51).

O valor de cada parâmetro é considerado diminuído se for inferior ao intervalo de referência, obtido a partir do grupo I por cálculo da média +/- 2.DP, normal se estiver dentro deste intervalo de referência e elevado se o valor for superior ao intervalo de referência. Com base nesta metodologia, os leucócitos, nomeadamente, os linfócitos estão aumentados e o cálcio total está ligeiramente diminuído.

Para avaliar as alterações sistémicas decorrentes da inoculação de cimento de forma mais precisa, fez-se a análise estatística de comparação entre os grupos I e III de onde se verificou que os animais do grupo III apresentavam contagens mais elevadas de leucócitos, nomeadamente de neutrófilos e linfócitos, também as plaquetas estavam aumentadas ao passo que o cálcio total estava diminuído.

Tabela 26 - Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo III.

Valores de hemograma para o Grupo III				Valores de bioquímica sérica para o Grupo III			
	Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência (Grupo I)		Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência (Grupo I)
Eritrócitos	6,9267	0,47488	5,92 - 7,90 10 ⁶ /ml	Glicose	143,66667	27,119489	109,23 - 175,17 mg/dl
Hemoglobina	13,216667	0,9217737	11,54 - 14,78 g/dl	Colesterol Total	79,00000	24,698178	48,13 - 122,67 mg/dl
Hematócrito	37,75	2,125	32,78 - 41,58 %	Triglicéridos	152,83333	72,485631	50,70 - 360,50 mg/dl
V. G. Médio	54,55000	1,461164	51,19 - 56,41 fl	Ureia	31,50000	4,230839	25,00 - 40,60 mg/dl
H. C. Média	19,21667	0,604704	18,0 - 20,12 pg	Creatinina	0,348000	0,0554076	0,32 - 0,44 mg/dl
C.H.C.Média	35,21667	0,658534	34,73 - 35,95 g/dl	Cálcio Total(S)	4,616667	0,1169045	4,68 - 5,68 mEq/l
Leucócitos	7,93333	2,962881	1,07 - 6,45 10 ³ /ml	Bilirrubina Total	0,196667	0,0150555	0,16 - 0,20 mg/dl
Fórmula Leucocitária				Bilirrubina directa	0,020000	0,0054772	0,02 mg/dl
				Bilirrubina indirecta	0,171667	0,0116905	0,14 - 0,18 mg/dl
Neutrófilos	1,68533	0,648840	0,14 - 1,75 10 ³ /ml	SGOT/AST	155,833333	26,1871470	99,71 - 219,29 u/l
Eosinófilos	0,040000	0,0148459	0,00 - 0,11 10 ³ /ml	SGPT/ALT	34,166667	6,1454590	20,02 - 57,97 u/l
Basófilos	0,008667	0,0124526	0 - 0,03 10 ³ /ml	Fosfatase Alcalina	39,666667	8,6178110	25,97 - 88,03 u/l
Monócitos	0,140667	0,0646024	0,00 - 0,20 10 ³ /ml	Proteínas totais	6,386667	0,6108246	5,86 - 7,94 g/dl
Linfócitos	6,059333	2,4221435	0,64 - 4,65 10 ³ /ml	Albumina	2,283333	0,2578113	1,77 - 3,03 g/dl
Plaquetas	814000,00	50675,438	79145,57 - 976454,43/ml	LDH	2074,666667	270,5096425	241,51 - 3708,09 u/l

A macroscopia da glândula mamária inoculada com cimento durante uma semana revela a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo, facilmente destacável, moderadamente definida e bem delimitada em torno do biomaterial que permaneceu compacto no local da inoculação.

A avaliação microscópica com HE revelou a presença de fibrina envolvida no cimento e de uma camada de tecido de granulação e fibroplasia (Figura 63, A). Em algumas porções havia já a formação de uma cápsula fibrosa muito bem definida e separada do material inoculado (Figura 63, B).

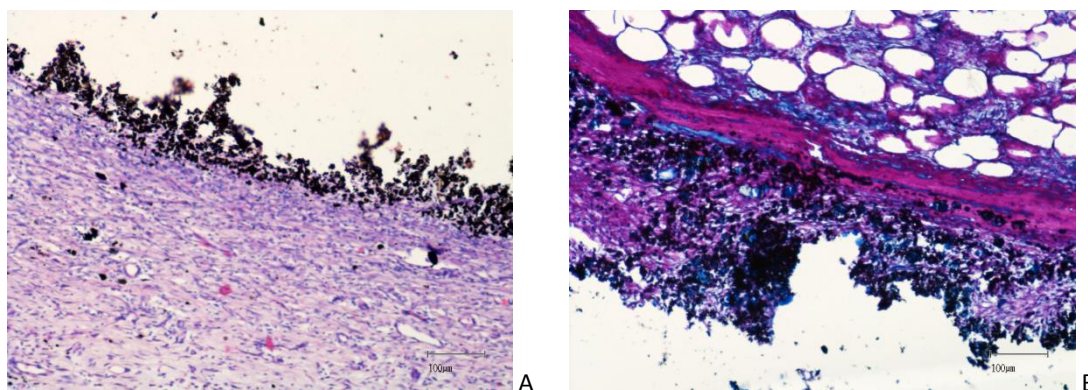


Figura 63 - Corte histopatológico de glândula mamária inoculada pelo biomaterial ferrimagnético. A) Tecido cicatricial imaturo com fibrina envolvida em cimento seguida de uma camada mais espessa de tecido de granulação (HE, 100x). B) Cápsula conjuntiva formada por tecido conjuntivo jovem (TM, 100x)

Na coloração de tricrômico de Masson, 6 glândulas mamárias inoculadas com cimento foram avaliadas na área circundante ao biomaterial e o resultado foi o seguinte: 4 (66,7%) apresentavam um estroma moderado, ou de nível 2 (Figura 63, B) e duas (33,3%) tinham tecido conjuntivo muito abundante, ou de nível 3. Estes resultados não foram diferentes do grupo I pela análise estatística.

Na coloração de azul de toluidina, a contagem média de mastócitos em 10 campos com aumento de 200x foi de 5,3667 (DP 4,69496). Comparativamente com o grupo I, o grupo III tem contagens diminuídas de mastócitos para área em avaliação que se restringiu à área circundante ao cimento.

A avaliação microscópica por imunohistoquímica revelou que nos tecidos circundantes ao cimento (Tabela 27), as células em apoptose ou seja as células com positividade à imunomarcação pela caspase 3 totalizaram em média 22,5% (DP 3,53) de intensidade 1. A imunomarcação pela HSP70 permitiu contar 15% (DP 7,07) de células basais ou do estroma, com intensidade 1. O anticorpo anti-CD3 marcou em média 35% (DP 7,07) das células do estroma (Figura 64), ou seja marcou linfócitos T presentes nos tecidos circundantes ao cimento. A imunomarcação de células pelo anticorpo Ki67 foi nula. A imunomarcação de células parenquimatosas não se aplica ao estudo da fibroplasia e, assim sendo, não foi avaliada. Comparativamente com o grupo I, de controlo, o grupo III obteve resultados estatisticamente significativos para a imunomarcação com o anticorpo anti-CD3 nas células do estroma que são mais numerosas do que no grupo controlo.

Tabela 27 – Caracterização imunohistoquímica de 2 glândulas mamárias inoculadas com cimento durante uma semana.

Anticorpos para imunomarcação	% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Ki67	0,0	0,0						
Caspase 3	22,5000	3,53553	22,5000	3,53553				
HSP 70	Células basais	15,0000	7,07107	15,0000	7,07107			
	Células luminais							
CD3	Estroma	35,0000	7,07107			35,0000	7,07107	
	Parênquima							

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

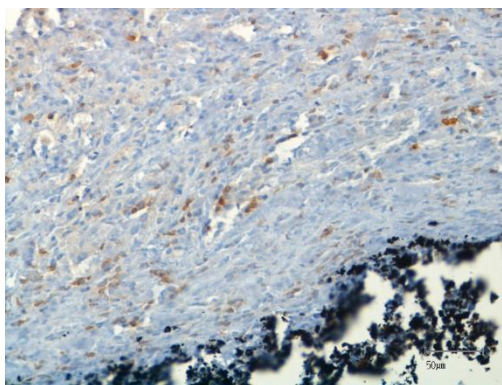


Figura 64 – Imunomarcação de cápsula conjuntiva circundante ao biomaterial inoculado no grupo III pelo anticorpo anti-CD3, (200x).

3.2. Caracterização dos efeitos tecidulares da termoterapia focal em neoplasias da glândula mamária

Os resultados obtidos pelo grupo V, onde se aplicou o protocolo de indução neoplásica e o protocolo de termoterapia local, são descritos nesta secção. Neste grupo, composto por 19 animais, formaram-se 81 tumores numa média de 4,26 tumores por animal. Em cada animal com neoplasias mamárias, a de maior dimensão foi submetida ao protocolo de termoterapia focal. Em conjunto, estes tumores tratados (t) formaram o sub-grupo Vt. Os tumores mamários não-tratados (nt) formaram o sub-grupo Vnt.

Os animais do grupo V pesaram em média, ao longo do período experimental, 275,681g (DP 2,871g), sem diferença significativa com o grupo II.

O volume médio das neoplasias foi de 3742,9547 mm³ (DP 6017,48702) e o peso médio foi de 1,4396g (DP 2,01878). Relativamente à caracterização macroscópica mais detalhada e à distribuição das neoplasias nas cadeias mamárias, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas com o grupo II.

Todos os animais do sub-grupo Vt foram radiografados para avaliação da localização intratumoral do cimento e em todos se verificou não só que este biomaterial tinha sido bem administrado como também estava distribuído por quase todo o volume de interesse.

A avaliação microscópica, por histoquímica (Figura 65) com coloração HE, das neoplasias que se desenvolveram no grupo V, revelou características histopatológicas semelhantes ao grupo II.

No sub-grupo Vt, no entanto, verificou-se a presença de necrose mais acentuada por vezes com alguma hemorragia associada. A coloração de TM foi aplicada a uma selecção de 6 tumores tratados, sendo três neoplasias de grau I e três neoplasias de grau II, e verificou-se que o tecido conjuntivo foi considerado moderado, ou de nível 2, em duas neoplasias (33,3%) e de nível 3 em 4 neoplasias (66,7%). No subgrupo Vnt, a semiquantificação de estroma neoplásico foi efectuada em 18 neoplasias, pela coloração TM. Estas neoplasias foram graduadas e 8 eram de grau I, 9 de grau II, 1 de grau III. A semiquantificação de tecido conjuntivo demonstrou que uma (5,6%) neoplasia tinha pouco tecido conjuntivo, de nível 1, 11 (61%) neoplasias apresentavam tecido conjuntivo moderado, de nível 2, e 6 (33,3%) neoplasias eram constituídas por um estroma muito evidente, ou de nível 3. Os testes estatísticos comparativos demonstraram que o sub-grupo Vt e o sub-grupo Vnt tinham mais tecido conjuntivo do que o grupo II. Entre os sub-grupos Vt e Vnt, a diferença na quantidade de tecido conjuntivo não foi estatisticamente significativa.

A evidenciação de mastócitos no sub-grupo Vt permitiu efectuar contagens que se ficaram pela média de 49,7 mastócitos/10 campos de 100x (DP 43,95). Estas células foram encontradas principalmente em associação com tecido conjuntivo (Figura 65, F). No sub-grupo Vnt a contagem de mastócitos foi em média 41,1 (DP 35,6). Comparativamente com o grupo II, a contagem média de mastócitos nos sub-grupos Vt e Vnt não foi significativamente diferente e entre estes sub-grupos também não se verificaram variações estatisticamente significativas.

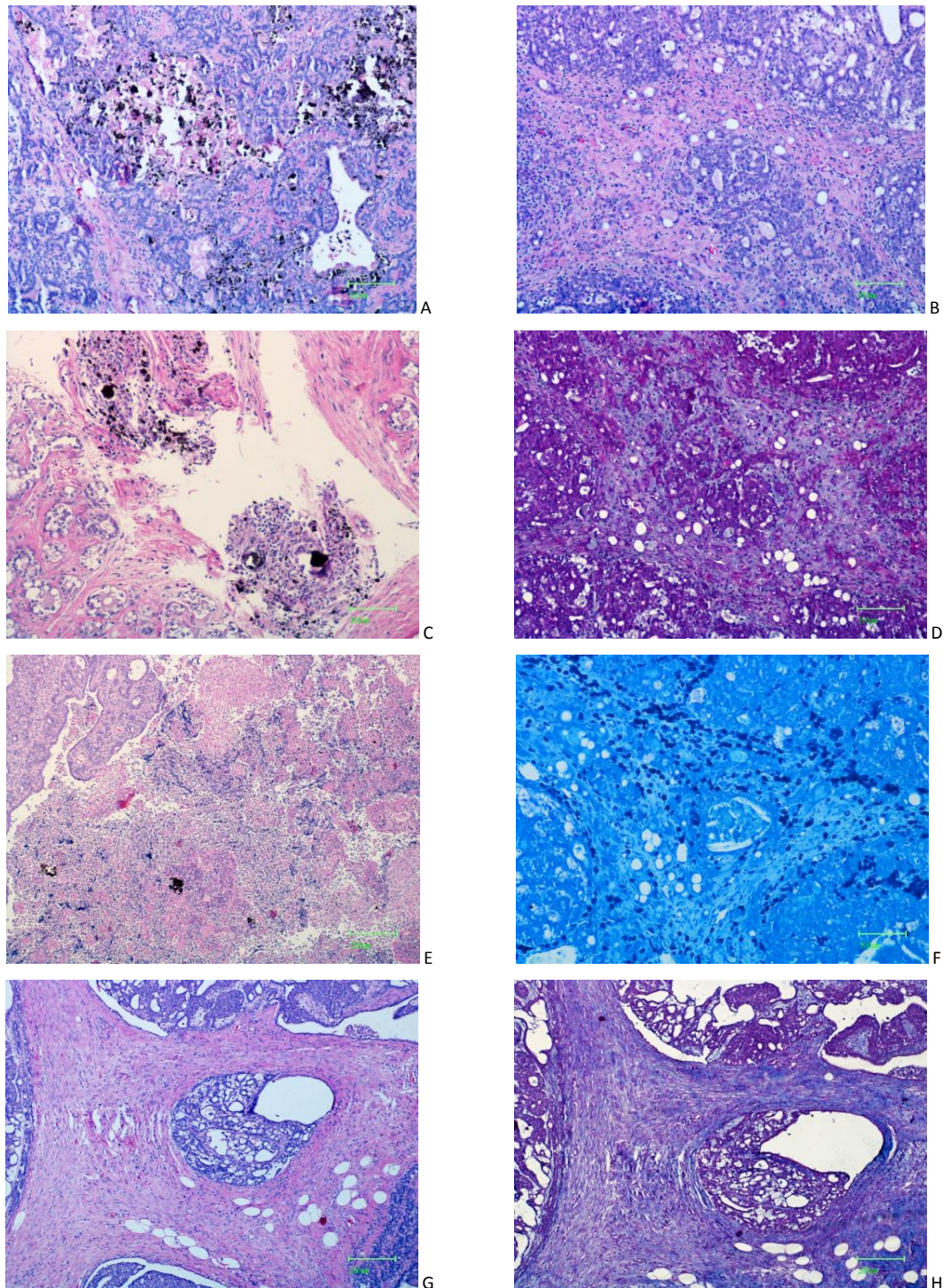


Figura 65 – Neoplasia mamária do grupo Vt onde se observa necrose muito ligeira (A) (HE, 100 x), moderada (C (HE, 100 x) e intensa (E) nos tecidos adjacentes ao cimento (biomaterial negro no tecido) após tratamento hipertérmico (HE, 100 x). O tecido conjuntivo é muito desenvolvido na maioria das neoplasias. Em B) pode observar-se a infiltração de tecido conjuntivo no parênquima tumoral semiquantificado em nível 2 (HE, 100x), em D) o tecido conjuntivo está selectivamente corado, (TM, 100x) e em F) observa-se grande infiltração de mastócitos ao longo das fibras conjuntivas, (AT, 100x). G) Presença muito acentuada de tecido conjuntivo, (HE, 50x) e H) Tecido conjuntivo semiquantificado em nível 3 (TM, 50x).

A caracterização microscópica da marcação molecular por imunohistoquímica aos tumores tratados do grupo V revelou que a imunomarcação para o receptor de estrogénio foi 60,83% (DP 17,15), considerada ligeira, ou de nível 1, em 24,81% (DP 18,55) das células marcadas, a intensidade foi moderada ou de nível 2, em 30,83% (DP 20,6) e foi considerada forte em 5,83% (DP 4,913). A imunomarcação da proliferação celular foi identificada pelo anticorpo anti-Ki67 em 8,6% (DP 4,68) das células, integralmente de baixa intensidade. A imunomarcação de apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 revelou que 27,5% (DP 14,74) das células foram positivas, das quais 21,67 (DP 17,22) marcaram com intensidade ligeira e 7% (DP 8,36) marcaram com intensidade moderada. O resultado das células com positividade para HSP70 nas células basais foi de 32,5% (DP 18,9), das quais 4,17 (DP 8,01) tinham imunomarcação ligeira e 28,33% (DP 27,33) marcaram com intensidade moderada. A percentagem de células luminais marcadas pelo mesmo anticorpo foi de 56,67% (DP 34,89), com intensidade ligeira em 14,17% (DP 23,75), intensidade moderada em 23,33% (DP 27,32) e intensidade forte em 19,17% (32,6). A imunomarcação de linfócitos T no estroma pelo anticorpo anti-CD3 foi de 22,5% (DP 14,4) de intensidade ligeira, nível 1, e de linfócitos T no parênquima foi de 9,67% (DP 8,73) com intensidade moderada, ou de nível 2.

Tabela 28 – Caracterização imunohistoquímica de 6 neoplasias mamárias tratadas por termoterapia focal na 26ª semana do período experimental.

Anticorpos para imunomarcação	% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Receptor de Estrogénio	60,8333	17,15129	24,1667	18,55173	30,8333	20,59531	5,8333	4,91596	
Ki67	8,6667	4,67618	8,6667	4,67618					
Caspase 3	27,5000	14,74788	21,6667	17,22401	7,0000	8,36660			
HSP 70	Células basais	32,5000	18,90767	4,1667	8,01041	28,3333	24,01388		
	Células luminais	56,6667	34,88075	14,1667	23,75219	23,3333	27,32520	19,1667	32,62157
CD3	Estroma	22,5000	14,40486	22,5000	14,40486				
	Parênquima	9,6667	8,73308			9,6667	8,73308		

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

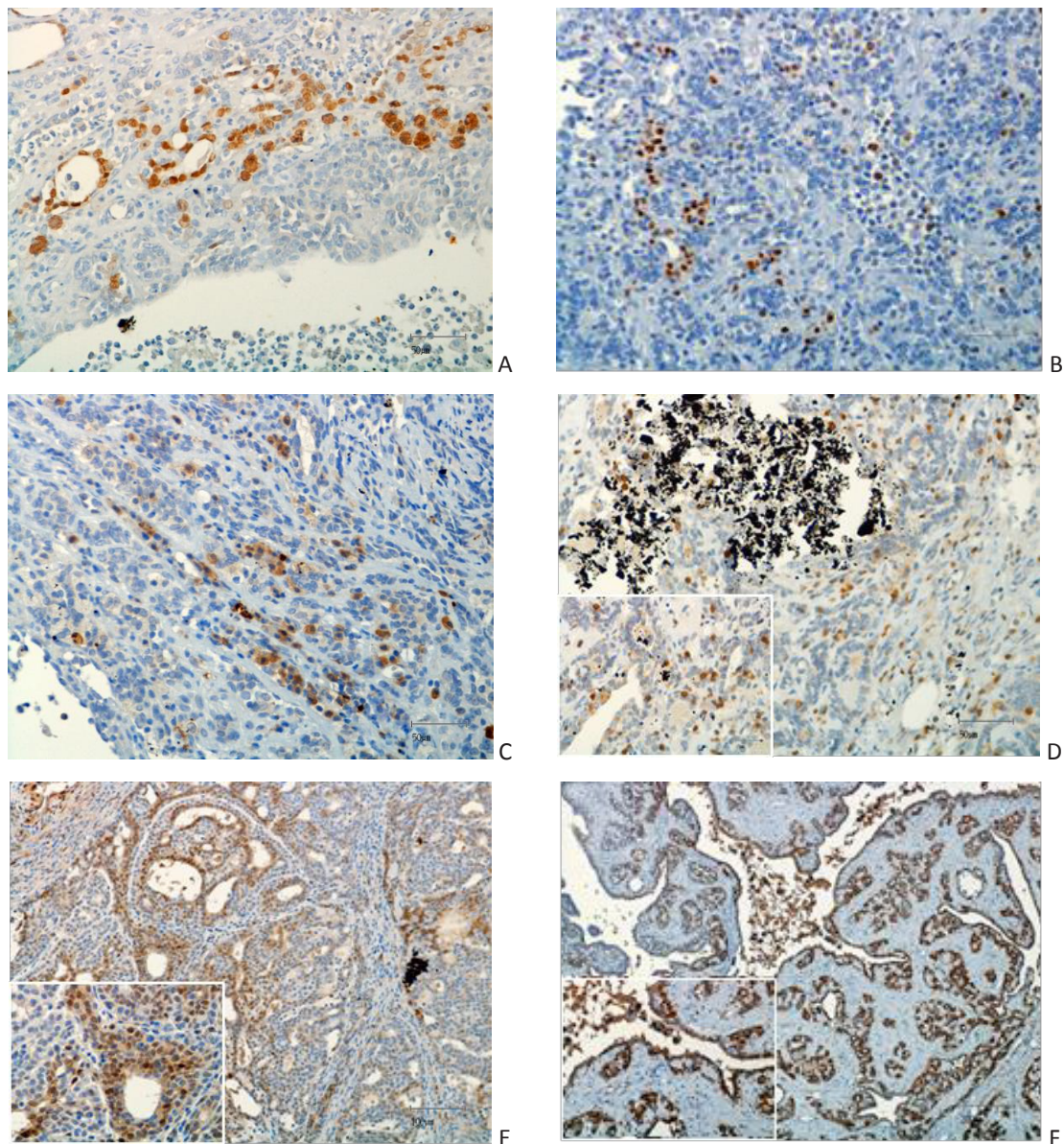


Figura 66 – Caracterização molecular por imunohistoquímica em tumores tratados por hipertermia focal. A) Imunomarcação nuclear dos receptores de estrogénio (x100). B) Marcação de células em proliferação pelo anticorpo anti-Ki67 (200x). C) Identificação de células em apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 (200x). D) Imunomarcação de linfócitos T no estroma e no parênquima de uma neoplasia mamária tratada pelo anticorpo anti- CD3 (200x) e pormenor da distribuição ampla dos linfócitos pelo tumor (400x). E) Imunomarcação celular pelo anticorpo anti-HSP70 com intensidade moderada, nível 2 (100x) e pormenor que destaca a marcação das células epiteliais neoplásicas numa área sólida (400x). F) Imunomarcação celular pelo anticorpo anti-HSP70 com intensidade de nível 3 (50x) e pormenor que destaca a marcação das células epiteliais neoplásicas numa área de padrão papilar (200x).

A caracterização microscópica da marcação molecular por imunohistoquímica dos tumores do sub-grupo Vnt (Tabela 29) revelou que a imunomarcação para o receptor de estrogénio foi de 62,5% (DP 23,8), tendo-se apresentado ligeira, ou de nível 1, em 15,83% (DP 9,17), com intensidade moderada ou de nível 2, em 39,17% (DP 19,34) das células marcadas e foi considerada forte em 7,5% (DP 7,6) do total de células positivas. A imunomarcação da proliferação celular foi identificada pelo anticorpo anti-Ki67 (Figura 67, A) em 15,17% (DP 8,1), com 12,5% (DP 7,56) no nível 1 de intensidade e 2,67% (DP 4,55) no nível de intensidade 2. A imunomarcação de apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 (Figura 67, B) revelou que 18,1% (DP 4,79) das células foram positivas com intensidade de marcação ligeira. O resultado das células com positividade para HSP70 (Figura 67, C) nas células basais foi de 8,33% (DP 8,16), com intensidade ligeira de marcação. A percentagem de células luminais marcadas pelo mesmo anticorpo foi de 25% (DP 10), com intensidade ligeira em 20% (DP 8,37) e intensidade moderada em 5,0 (DP 8,37). A imunomarcação de linfócitos T no estroma pelo anticorpo anti-CD3 (Figura 67, D) foi de 17,5% (DP 12,55) de intensidade moderada, nível 2, e de linfócitos T no parênquima foi de 6,67% (DP 2,58) igualmente com intensidade moderada.

Tabela 29 – Caracterização imunohistoquímica de 6 neoplasias mamárias não-tratadas por termoterapia focal que se desenvolveram em animais tratados à 26ª semana do período experimental.

Anticorpos para imunomarcação	% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Receptor de Estrogénio	62,5000	23,82226	15,8333	9,17424	39,1667	19,34339	7,5000	7,58288
Ki67	15,1667	8,10967	12,5000	7,55645	2,6667	4,54606		
Caspase 3	18,1667	4,79236	18,1667	4,79236				
HSP 70	Células basais	8,3333	8,16497	5,8333	8,01041	2,5000	4,18330	
	Células luminais	25,0000	10,00000	20,0000	8,36660	5,0000	8,36660	
CD3	Estroma	17,5000	12,54990			17,5000	12,54990	
	Parênquima	6,6667	2,58199			6,6667	2,58199	

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

No âmbito da avaliação estatística comparativa das imunohistoquímicas, verificou-se que a imunomarcação da caspase 3 é mais abrangente nos sub-grupos Vt e Vnt, relativamente ao grupo II e que é mais acentuada no sub-grupo Vt do que no sub-grupo Vnt.

A imunomarcação para HSP70 foi maior no sub-grupo Vt relativamente ao sub-grupo Vnt e ao grupo II.

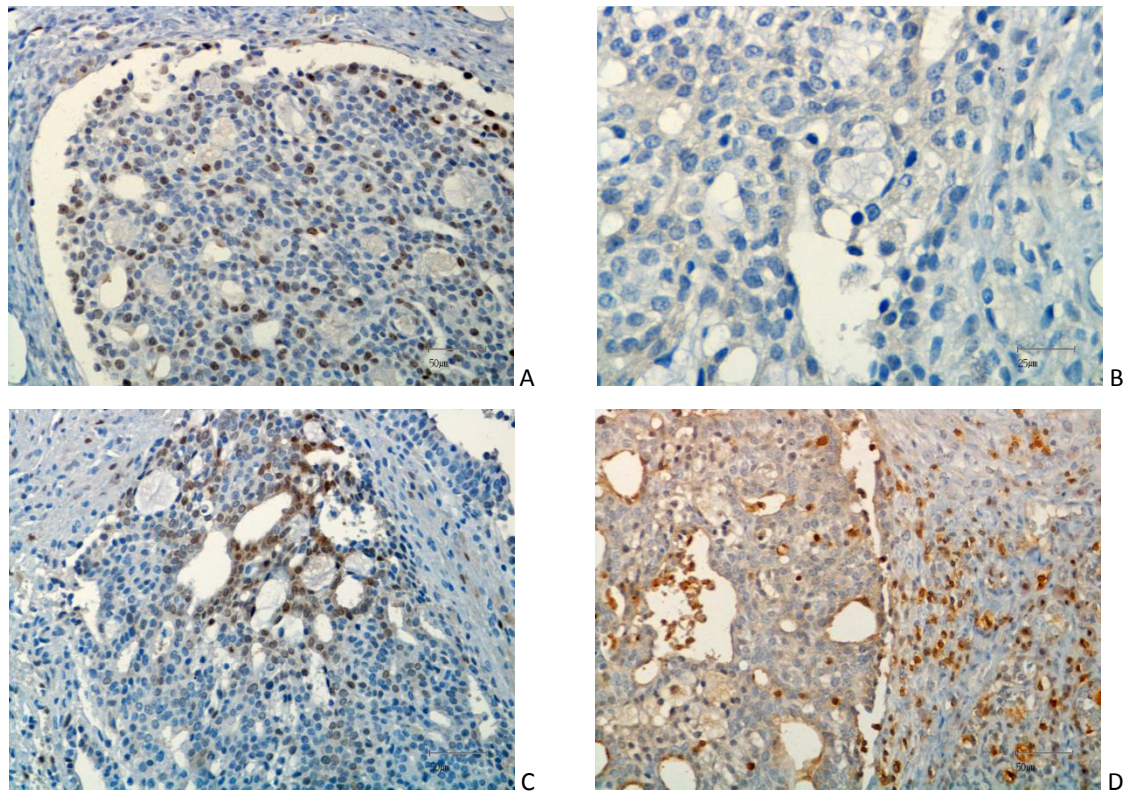


Figura 67 – Caracterização molecular por imunohistoquímica em tumores não-tratados por hipertermia focal provenientes de animais tratados. A) Marcação de células em proliferação pelo anticorpo anti-Ki67 (200x). B) Identificação de células em apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 com imunomarcacão de intensidade ligeira (400x). C) Imunomarcacão celular pelo anticorpo anti-HSP70 com intensidade moderada e forte, níveis 2 e 3, respectivamente (200x). D) Imunomarcacão de linfócitos T no estroma, lado esquerdo, e no parênquima, lado direito, de uma neoplasia mamária marcada pelo anticorpo anti-CD3 (200x).

4. Caracterização da terapia complementar

4.1. Avaliação dos efeitos sistémicos e tecidulares da terapia complementar em animais sem indução neoplásica

Os animais que constituíram o grupo IV receberam terapia complementar de diferenciação celular no sentido da linha osteoblástica. Um sub-grupo, denominado de IVa, recebeu vitamina D3 por administração intraperitoneal na dose 20µg/Kg IP durante três semanas, da semana 24-26 do período de experimentação. O outro sub-grupo, denominado de IVb, recebeu o mesmo protocolo de vitamina D3 adicionado de dexametasona na dose de 0,5mg/kg por via intramuscular durante o mesmo período de tempo. Todos os animais foram pesados semanalmente até ao sacrifício, altura em que a colheita de sangue e o exame *post-mortem* completo foram efectuados. Os dados obtidos por estes registos foram processados por métodos de estatística.

O peso médio dos animais do sub-grupo IVa foi de 279,295g (DP 3,772), enquanto no sub-grupo IVb o peso médio foi de 274,494g (DP 3,534g). Em comparação com o grupo I, controlo geral, não se observaram diferenças estatisticamente significativas. A macroscopia das glândulas mamárias deste grupo foi semelhante ao grupo I, ou seja, mantiveram os critérios de normalidade.

O sangue colhido foi avaliado para quantificação de parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica (Tabela 30). Todos os resultados que se seguem estão expressos em média seguida do desvio padrão (DP).

Os animais do grupo IVa obtiveram os seguintes valores de hemograma relacionados com a linha eritrocitária: $7,07 \cdot 10^6$ eritrócitos/ml (DP 0,28), 13,36g de hemoglobina/dl (DP 0,71), 37,96% de hematócrito (DP 1,623), 54,5 fl de VGM (DP 0,7), 19,0 pg de HCM (DP 0,64) e 35,2 g/dl de CHCM (DP 0,88). No hemograma e dentro da linha leucocitária obteve-se a contagem de $3,0 \cdot 10^3$ leucócitos/ml (DP 0,81), dentro os quais $0,46 \cdot 10^3$ /ml neutrófilos (DP 0,12), $0,02 \cdot 10^3$ /ml eosinófilos (DP 0,012), $0,015 \cdot 10^3$ /ml basófilos (DP 0,004), $0,064 \cdot 10^3$ /ml monócitos (DP 0,028) e $2,44 \cdot 10^3$ /ml linfócitos (DP 0,68). A contagem média de plaquetas foi de 758600,00/ml (DP 125725.097). Nos parâmetros analisados de bioquímica sérica os resultados médios e de desvio padrão foram: glicose 144,6mg/dl (DP 16,94), colesterol total 79,8mg/dl (DP 10,7), triglicéridos 166,6 mg/dl (DP 35,8), ureia 36,6 mg/dl (DP 4,5), creatinina 0,39mg/dl (DP 0,12), cálcio total 4,78 mEq/l (DP 0,17), bilirrubina total de 0,184mg/dl (DP 0,02) composta por 0,042mg/dl de bilirrubina directa (DP 0,016) e por 0,14mg/dl de bilirrubina indirecta (DP 0,014), AST 116,2 u/l (DP 10,03), ALT 40,6 u/l (DP 4,56), FA 42,2u/l (DP 16,18), proteínas totais 6,81g/dl (DP 0,63), albumina 2,63g/dl (DP 0,2), LDH 1474,600 000u/l (DP 376,1034432).

Todos os parâmetros analisados do sub-grupo IVa obtiveram valores médios dentro do intervalo de referência, à excepção da bilirrubina indirecta que está ligeiramente aumentada. Não obstante os testes estatísticos de comparação revelaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo IVa e o grupo I nos parâmetros: cálcio total, onde o grupo IVa tem valores inferiores relativamente ao grupo I, bilirrubina directa, com o grupo IVa a apresentar valores médios superiores ao grupo I, ao contrário da bilirrubina indirecta onde se verifica que o grupo IVa tem valores inferiores ao grupo controlo, o mesmo acontecendo com a AST.

Tabela 30 - Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo IV.

Valores de hemograma para o Grupo IV						Valores de bioquímica sérica para o Grupo IV					
IVa			IVb			IVa					IVb
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência (Grupo I)		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência (Grupo I)
Eritrócitos	7,0650	0,28030	7,0367	0,29453	5,92 - 7,90 10 ⁶ /ml	Glicose	144,60000	16,949926	168,00000	23,091124	109,23 - 175,17 mg/dl
Hemoglobina	13,360000	0,7127412	13,433333	0,5006662	11,54 - 14,78 g/dl	Colesterol Total	79,80000	10,709809	69,00000	10,373042	48,13 - 122,67 mg/dl
Hematócrito	37,96	1,623	38,73	2,225	32,78 - 41,58 %	Triglicéridos	166,60000	35,809217	193,16667	86,518014	50,70 - 360,50 mg/dl
V. G. Médio	54,10000	0,702377	55,03333	1,675311	51,19 - 56,41 fl	Ureia	36,60000	4,505552	32,66667	3,881580	25,00 - 40,60 mg/dl
H. C. Média	19,00000	0,637704	19,08333	0,354495	18,0 - 20,12 pg	Creatinina	0,392000	0,1198749	0,316665	0,0233832	0,32 - 0,44 mg/dl
C.H.C.Média	35,20000	0,886002	34,71667	0,879583	34,73 - 35,95 g/dl	Cálcio Total(S)	4,780000	0,1788854	4,816667	0,0983192	4,68 - 5,68 mEq/l
Leucócitos	3,00000	0,812404	2,63333	0,688961	1,07 - 6,45 10 ³ /ml	Bilirrubina Total	0,184000	0,0207364	0,175000	0,0164317	0,16 - 0,20 mg/dl
Fórmula Leucocitária						Bilirrubina directa	0,042000	0,0164317	0,031667	0,0075277	0,03-0,07 mg/dl
						Bilirrubina indirecta	0,142000	0,0148324	0,143333	0,0121106	0,02-0,13 mg/dl
Neutrófilos	0,46020	0,120711	0,43667	0,107916	0,14 - 1,75 10 ³ /ml	AST	116,200000	10,0349390	125,333333	61,7111551	99,71 - 219,29 u/l
Eosinófilos	0,022200	0,0127161	0,018500	0,0085965	0,00 - 0,11 10 ³ /ml	ALT	40,600000	4,5607017	42,333333	3,0767949	20,02 - 57,97 u/l
Basófilos	0,015400	0,0041593	0,015667	0,0084538	0 - 0,03 10 ³ /ml	Fosfatase Alcalina	42,200000	16,1771444	43,000000	5,6568542	25,97 - 88,03 u/l
Monócitos	0,064200	0,0280393	0,052167	0,0223823	0,00 - 0,20 10 ³ /ml	Proteínas totais	6,816000	0,6335850	6,170000	0,3967367	5,86 - 7,94 g/dl
Linfócitos	2,438800	0,6783146	2,110667	0,5568934	0,64 - 4,65 10 ³ /ml	Albumina	2,630000	0,2073644	2,356667	0,1675311	1,77 - 3,03 g/dl
Plaquetas	758600,00	125725,097	581666,67	282062,168	79145,57 - 976454,43/ml	LDH	1474,600000	376,1034432	1434,166667	507,4758779	241,51 - 3708,09 u/l

Os animais do grupo IVb obtiveram os seguintes valores de hemograma relacionados com a linha eritrocitária: $7,07 \cdot 10^6$ eritrócitos/ml (DP 0,29), 13,43g de hemoglobina/dl (DP 0,50), 38,73% de hematócrito (DP 0,5), 55,03 fl de VGM (DP 1,6), 19,08 pg de HCM (DP 0,35) e 34,7g/dl de CHCM (DP 0,88). No hemograma e dentro da linha leucocitária obteve-se a contagem de $2,63 \cdot 10^3$ leucócitos/ml (DP 0,68), dentro os quais $0,43 \cdot 10^3$ /ml neutrófilos (DP 0,11), $0,019 \cdot 10^3$ /ml eosinófilos (DP 0,008), $0,016 \cdot 10^3$ /ml basófilos (DP 0,008), $0,052 \cdot 10^3$ /ml monócitos (DP 0,022) e $2,11 \cdot 10^3$ /ml linfócitos (DP 0,56). A contagem média de plaquetas foi de 581666,67/ml (DP 282062,168). Nos parâmetros analisados de bioquímica sérica os resultados médios e de desvio padrão foram: glicose 168,0mg/dl (DP 23,09), colesterol total 69,0mg/dl (DP 23,09), triglicéridos 193,17mg/dl (DP 86,5), ureia 32,67mg/dl (DP 3,88), creatinina 0,32mg/dl (DP 0,023), cálcio total 4,81mEq/l (DP 0,098), bilirrubina total 0,175mg/dl (DP 0,016) composta por 0,031mg/dl de bilirrubina directa (DP 0,0075) e por 0,14mg/dl de bilirrubina indirecta (DP 0,012), AST 125,33u/l (DP 61,71), ALT 42,33u/l (DP 3,077), FA 43,0u/l (DP 5,66), proteínas totais 6,17g/dl (DP 0,397), albumina 2,35g/dl (DP 0,168), LDH 1434,166667u/l (DP 507,4758779).

Todos os parâmetros analisados do sub-grupo IVb obtiveram valores médios dentro do intervalo de referência, à exceção da bilirrubina indirecta que está ligeiramente aumentada. Entre o sub-grupo IVb e o grupo I, os valores médios de neutrófilos estão diminuídos no sub-grupo IVb, assim como a creatinina, o cálcio total, a bilirrubina indirecta e as proteínas totais. A bilirrubina directa, pelo contrário está aumentada no sub-grupo IVb relativamente ao grupo I.

Entre os sub-grupos que compõem o grupo IV o único parâmetro que uma diferença estatisticamente significativa é a albumina, que é inferior no sub-grupo IVb.

A avaliação histopatológica da sexta glândula mamária inguinal direita com HE (Figura 68, A e C) revelou a presença de estroma mais abundante sobretudo no sub-grupo IVb, mas também no sub-grupo IVa. Na coloração de TM (Figura 68, B e D), o tecido conjuntivo evidenciado e semiquantificado em níveis de 1-3 revelou que dos 5 casos que compõem o sub-grupo IVa, 4 glândulas mamárias apresentavam um estroma moderado, ou de nível 2 e uma tinha tecido conjuntivo muito abundante, ou de nível 3. Nas seis glândulas mamárias dos animais do grupo IVb, uma apresentava tecido conjuntivo residual, ou de nível 1, duas apresentavam um estroma moderado, ou de nível 2 e três tinham tecido conjuntivo muito abundante, ou de nível 3.

A coloração azul de toluidina evidenciou os mastócitos e a contagem média no sub-grupo IVa foi de 14,14/10 campos de 200x, com desvio padrão de 5,5 e no grupo IVb foi de 11,60/10 campos de 200x, com desvio padrão de 3,11. Estes sub-grupos, quando comparados entre si e quando comparados individualmente com o grupo I não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

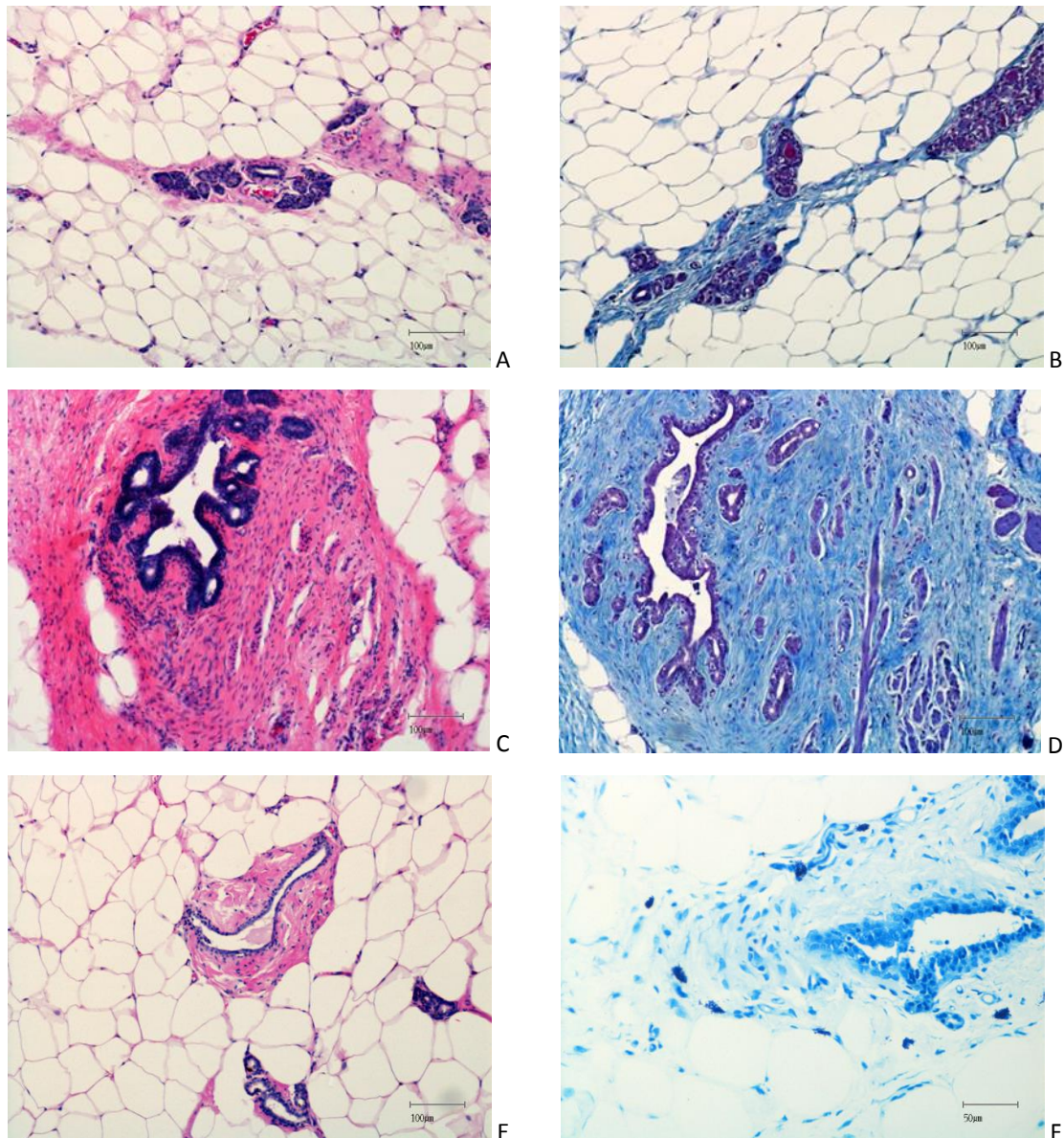


Figura 68 – Glândula mamária de um animal com protocolo de terapia complementar. A) Sub-grupo com administração de colecalciferol onde se observa o estroma mamário (HE,100x). B) Tecido conjuntivo de (A) evidenciado por tricrômico de Masson e nivelado em moderado ou 2 (TM, 100x). C) Glândula mamária de um animal com protocolo de terapia complementar com administração de colecalciferol e dexametasona onde se observa o estroma mamário (HE, 100x). D) Evidenciação do tecido conjuntivo de C) por TM, nivelado em forte ou 3 (TM, 100x). E) e F) Glândula mamária do grupo IVa em HE e AT, respectivamente, com evidenciação metacromática de escassos mastócitos, (HE, 100x e AT, 200x)

A caracterização imunohistoquímica das glândulas mamárias do grupo IVa está resumida na Tabela 31. A imunomarcação da proliferação pelo Ki67 ocorre em 0,5% das células (DP 0,40) numa intensidade de nível 1, a imunomarcação de linfócitos T no parênquima glandular permite contar uma média de 12,5% (DP 6,45) células numa intensidade moderada. A imunomarcação do estroma pelo anticorpo anti-osteopontina revelou marcação ausente em 4 preparações (de 5) e marcação ligeira numa preparação (de 5).

Tabela 31 – Caracterização imunohistoquímica do grupo IVa.

Anticorpos para imunomarcação		% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Ki67		0,5000	0,40825	0,5000	0,40825				
Caspase 3		0,0000	0,0000						
CD3	Estroma	0,0000	0,0000						
	Parênquima	12,5000	6,45497			12,5000	6,45497		
Osteopontina (valores absolutos)		Imunomarcação nível 0		Imunomarcação nível 1		Imunomarcação nível 2		Imunomarcação nível 3	
		4		1		0		0	

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

A caracterização imunohistoquímica das glândulas mamárias do grupo IVb está resumida na Tabela 32. A imunomarcação da proliferação pelo Ki67 ocorre em 0,33% das células (DP 0,28) numa intensidade de nível 1, a imunomarcação de linfócitos T no parênquima glandular (Figura 69) permite contar uma média de 3,67% (DP 2,31) células numa intensidade moderada. Em ambos os grupos, nenhuma célula marcou na imunohistoquímica com o anticorpo anti-caspase 3 e nenhum linfócito T marcado pelo anticorpo anti-CD3 estava presente no estroma das glândulas mamárias. A imunomarcação do estroma pelo anticorpo anti-osteopontina revelou marcação ausente em 2 preparações (de 6), marcação ligeira em 3 preparações (de 6) e marcação moderada numa preparação (de 6).

Tabela 32 – Caracterização imunohistoquímica do grupo IVb.

Anticorpos para imunomarcação		% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Ki67		0,3333	0,28868	0,3333	0,28868				
Caspase 3		0,0000	0,0000						
CD3	Estroma	0,0000	0,0000						
	Parênquima	3,6667	2,30940			3,6667	2,30940		
Osteopontina (valores absolutos)		Imunomarcação nível 0		Imunomarcação nível 1		Imunomarcação nível 2		Imunomarcação nível 3	
		2		3		1		0	

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

Os testes estatísticos de comparação de dados revelaram que estes sub-grupos, quando comparados entre si e quando comparados individualmente com o grupo I não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

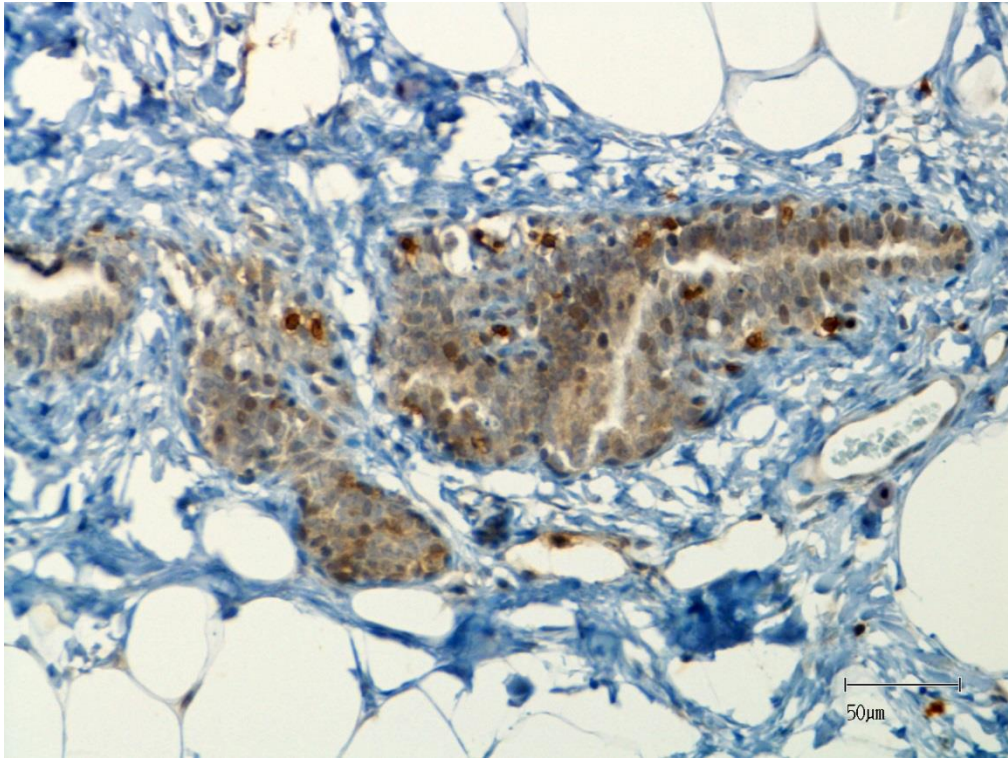


Figura 69 – Glândula mamária do grupo IV com imunomarcção pelo anticorpo anti-CD3 que marca os linfócitos T. Notar a distribuição parenquimatosa destas células imunitárias, (200x).

4.2. Avaliação dos efeitos sistémicos e tecidulares da terapia complementar em animais com indução neoplásica

Os 11 animais submetidos ao protocolo de indução neoplásica no grupo VI desenvolveram, em conjunto, 29 neoplasias mamárias, com uma média de 2,63 neoplasias por animal. À 24ª semana do período experimental, estes animais foram separados em dois sub-grupos com o mesmo número de neoplasias, aproximadamente. Assim, constituiu-se um sub-grupo, denominado de VIa, com 4 animais que tinham desenvolvido 14 neoplasias. Estes animais receberam semanalmente colecalciferol na dose de 20µ/Kg intraperitoneal, da 24ª à 26ª semana. Os restantes 7 animais tinham desenvolvido ao todo 15 neoplasias e constituíram o sub-grupo VIb que recebeu semanalmente colecalciferol na dose de 20µ/Kg intraperitoneal e dexametasona na dose de 0,5mg/Kg intramuscular.

Ao longo do período experimental a pesagem semanal permitiu registar e processar o peso individual dos animais. Processados esses dados, obteve-se o peso médio de 280.583g com um erro padrão de 3,610, no sub-grupo VIa, e de 296,983g com erro padrão de 2,759 para os animais do sub-grupo VIb. Os testes estatísticos de comparação entre os grupos resultaram numa diferença estatisticamente significativa entre o sub-grupo VIb e todos os outros grupos. Os animais do sub-grupo VIb foram mais pesados do que todos os restantes animais que compuseram deste estudo.

A colheita de sangue a os resultados das análises de hemograma e de bioquímica sérica constam da Tabela 33. Os animais do grupo IVa obtiveram os seguintes valores de hemograma relacionados com a linha eritrocitária: $6,748 \cdot 10^6$ eritrócitos/ml (DP 0,40), 13,22g de hemoglobina/dl (DP 0,11), 36,5% de hematócrito (DP 1,81), 54,12 fl de VGM (DP 1,28), 19,64 pg de HCM (DP 1,17) e 36,3g/dl de CHCM (DP 1,65). No hemograma e dentro da linha leucocitária obteve-se a contagem de $5,22 \cdot 10^3$ leucócitos/ml (DP 1,9), dentro os quais $1,26 \cdot 10^3$ /ml neutrófilos (DP 0,72), $0,05 \cdot 10^3$ /ml eosinófilos (DP 0,072), $0,015 \cdot 10^3$ /ml basófilos (DP 0,009), $0,115 \cdot 10^3$ /ml monócitos (DP 0,047) e $3,775 \cdot 10^3$ /ml linfócitos (DP 1,2). A contagem média de plaquetas foi de 978000,00/ml (DP 290004,310). Nos parâmetros analisados de bioquímica sérica os resultados médios e de desvio padrão foram: glicose 173,6mg/dl (DP 15,68), colesterol total 85,4mg/dl (DP 34,49), triglicéridos 193,0 mg/dl, ureia 41,0 mg/dl (DP 7,5), creatinina 0,36mg/dl (DP 0,04), cálcio total 4,92 mEq/l (DP 0,148), bilirrubina total de 0,138mg/dl (DP 0,038) composta por 0,042mg/dl de bilirrubina directa (DP 0,018) e por 0,096mg/dl de bilirrubina indirecta (DP 0,021), AST 207,4u/l (DP 57,89), ALT 42,3u/l (DP 15,94), FA 41,4u/l (DP 4,34), proteínas totais 6,26g/dl (DP 0,60), albumina 2,38g/dl (DP 0,29), LDH 1574,200000u/l (DP 588,8834350).

A interpretação destes dados faz-se por comparação com o intervalo de referência obtido a partir grupo controlo. Neste âmbito, a CHCM está ligeiramente aumentada, assim como as plaquetas e a ureia. Os testes estatísticos de comparação entre grupos revelaram que o sub-grupo VIa apresentava uma elevação da glicémia e da bilirrubina directa e uma diminuição da bilirrubina total e da bilirrubina indirecta, relativamente ao grupo I. Entre os sub-grupos que receberam apenas vitamina D3, IVa e VIa, as diferenças nos parâmetros de hemograma relacionam-se com os leucócitos e neutrófilos que são mais numerosos no sub-grupo com neoplasias mamárias, do mesmo modo que a glicose e a AST estão mais elevadas no sub-grupo VIa.

Tabela 33 - Valores dos parâmetros de hemograma e de bioquímica sérica para os animais do grupo VI.

Valores de hemograma para o Grupo VI						Valores de bioquímica sérica para o Grupo VI					
Via		Via				Via		Via			
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência (Grupo I)		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Intervalo de referência (Grupo I)
Eritrócitos	6,7480	0,40653	6,9850	0,28571	5,92 - 7,90 10 ⁶ /ml	Glicose	173,60000	15,678010	181,83333	14,358505	109,23 - 175,17 mg/dl
Hemoglobina	13,220000	0,1095445	13,733333	0,7527727	11,54 - 14,78 g/dl	Colesterol Total	85,40000	34,486229	63,20000	4,086563	48,13 - 122,67 mg/dl
Hematócrito	36,50	1,810	38,25	2,370	32,78 - 41,58 %	Triglicéridos	193,00000*		172,50000	72,709697	50,70 - 360,50 mg/dl
V. G. Médio	54,12000	1,279453	54,71667	1,433062	51,19 - 56,41 fl	Ureia	41,00000	7,516648	30,00000	4,335897	25,00 - 40,60 mg/dl
H. C. Média	19,64000	1,165333	19,66667	0,398330	18,0 - 20,12 pg	Creatinina	0,357998	0,0408698	0,283333	0,0175119	0,32 - 0,44 mg/dl
C.H.C.Média	36,30000	1,650757	35,90000	0,379473	34,73 - 35,95 g/dl	Cálcio Total(S)	4,920000	0,1483240	4,916667	0,1834848	4,68 - 5,68 mEq/l
Leucócitos	5,22000	1,904468	4,46667	2,216905	1,07 - 6,45 10 ³ /ml	Bilirrubina Total	0,138000	0,0383406	0,125000	0,0225832	0,16 - 0,20 mg/dl
Fórmula Leucocitária						Bilirrubina directa	0,042000	0,0178885	0,033333	0,0150555	0,03-0,07 mg/dl
						Bilirrubina indirecta	0,096000	0,0207364	0,091667	0,0194079	0,02-0,13 mg/dl
Neutrófilos	1,26440	0,724015	1,20750	0,687609	0,14 - 1,75 10 ³ /ml	AST	207,400000	57,8860950	143,833333	35,6562290	99,71 - 219,29 u/l
Eosinófilos	0,050800	0,0722129	0,034000	0,0175613	0,00 - 0,11 10 ³ /ml	ALT	42,333333	15,9373775	42,666667	10,7827022	20,02 - 57,97 u/l
Basófilos	0,015200	0,0097314	0,018500	0,0109133	0 - 0,03 10 ³ /ml	Fosfatase Alcalina	41,400000	4,3358967	54,166667	24,3344749	25,97 - 88,03 u/l
Monócitos	0,114600	0,0473793	0,086167	0,0414749	0,00 - 0,20 10 ³ /ml	Proteínas totais	6,266000	0,6044253	5,920000	0,4392721	5,86 - 7,94 g/dl
Linfócitos	3,775400	1,2086272	3,121000	1,5777615	0,64 - 4,65 10 ³ /ml	Albumina	2,380000	0,2874022	2,113333	0,1986622	1,77 - 3,03 g/dl
Plaquetas	978000,00	290004,310	757833,33	137389,107	79145,57 - 976454,43/ml	LDH	1574,200000	588,8834350	1613,833333	453,6850964	241,51 - 3708,09 u/l

*este valor corresponde à análise de um animal, nas restantes amostras sanguíneas não se obtiveram valores para os triglicéridos.

Os animais do grupo IVb obtiveram os seguintes valores de hemograma relacionados com a linha eritrocitária: 6,98.10⁶ eritrócitos/ml (DP 0,29), 13,73g de hemoglobina/dl (DP 0,75), 38,25% de hematócrito (DP 2,37), 54,71 fl de VGM (DP 1,43), 19,66 pg de HCM (DP 0,398) e 35,9g/dl de CHCM (DP 0,38). No hemograma e dentro da linha leucocitária obteve-se a contagem de 4,47.10³ leucócitos/ml (DP 2,22), dentro os quais 1,21.10³/ml neutrófilos (DP 0,69), 0,034.10³/ml eosinófilos (DP 0,018), 0,019.10³/ml basófilos (DP 0,011), 0,086.10³/ml monócitos (DP 0,041) e 3,12.10³/ml linfócitos (DP 1,58). A contagem média de plaquetas foi de 757833,33/ml (DP 137389,107). Nos parâmetros analisados de bioquímica sérica os resultados médios e de desvio padrão foram: glicose 181,8mg/dl (DP 14,36), colesterol total 63,2mg/dl (DP 4,087), triglicéridos 172,5 mg/dl (DP 72,7), ureia 30,0 mg/dl (DP 4,33), creatinina 0,28mg/dl (DP 0,018), cálcio total 4,92 mEq/l (DP 0,183), bilirrubina total de 0,135mg/dl (DP 0,022) composta por 0,033mg/dl de bilirrubina directa (DP 0,015) e por 0,092mg/dl de bilirrubina indirecta (DP 0,019), AST 143,8u/l (DP 35,66), ALT 42,6u/l (DP 10,78), FA 54,17u/l (DP 24,3), proteínas totais 5,92g/dl (DP 0,44), albumina 2,11g/dl (DP 0,198), LDH 1613,833333u/l (DP

453,6850964). Estes valores indicam uma elevação da glicose e uma diminuição muito ligeira da bilirrubina total.

Os testes estatísticos de comparação entre grupos indicam que há diferenças estatisticamente significativas entre o sub-grupo VIb e o grupo I, nomeadamente nos parâmetros de glicémia, que está aumentada no sub-grupo VIa, e nos valores médios de colesterol total, creatinina, bilirrubina total, bilirrubina indirecta e proteínas que estão diminuídos também neste sub-grupo.

Entre os sub-grupos que receberam o mesmo tipo de terapia complementar com vitamina D e dexametasona, IVb e VIb, os neutrófilos estão aumentados no sub-grupo com neoplasias e os parâmetros: creatinina, bilirrubina total, directa e indirecta e albumina estão diminuídos face ao sub-grupo IVb.

Passando agora à avaliação dos valores médios obtidos em clínica laboratorial entre os sub-grupos que compõem o grupo VI, a glicémia do sub-grupo VIb, apesar de carecer de significância estatística, está mais elevada do que no sub-grupo VIa.

A avaliação macroscópica dos tumores recolhidos dos animais do sub-grupo VIa resultou num volume médio de $7539,9623\text{mm}^3$ (DP 19819,51090) com peso médio de 2,6677g (DP 5,25708). No sub-grupo VIb, o volume médio das neoplasias foi de $979,9617\text{mm}^3$ (DP 910,78221) com peso médio de 0,7493g (DP 0,69471). Os tumores do grupo VIb eram de menor volume e de menor peso. No entanto as diferenças entre os diferentes grupos não são estatisticamente significativas. Nestes sub-grupos, a caracterização macroscópica mais detalhada e a distribuição das neoplasias nas cadeias mamárias não foram diferentes das encontradas para o grupo II, mediante a aplicação dos testes estatísticos apropriados.

No exame microscópico estas neoplasias revelaram ser constituídas por padrões histológicos variados e semelhantes ao grupo II. No entanto, e de forma transversal, apresentavam uma quantidade elevada de estroma (Figura 70), havendo inclusive duas neoplasias do sub-grupo VIb em fase de remissão com o parênquima tumoral praticamente substituído por tecido conjuntivo (Figura 70, D e E). Nestas neoplasias, as células parenquimatosas são muito escassas e com uma morfologia glandular luminal com forte presença de uma pigmentação dourada acastanhada no citoplasma. Esta pigmentação também surge entre as fibras conjuntivas dando a noção de que provêm de células epiteliais aí presentes anteriormente e tem composição férrica, já que corou de azul pelo azul da Prússia (Figura 70, F).

Na coloração de TM, 5 neoplasias mamárias proveniente de animais do grupo VIa (três de grau I, um de grau II e um de grau III) foram avaliadas e o resultado foi o seguinte: 2 apresentavam um estroma moderado, ou de nível 2 e três neoplasias tinham tecido conjuntivo muito abundante, ou de nível 3. No grupo VIb, 8 neoplasias mamárias (5 de grau I, uma de grau II e duas de grau 3) foram avaliadas e o resultado foi o seguinte: 4 apresentavam um estroma moderado, ou de nível 2 e 5 neoplasias tinham tecido conjuntivo muito abundante, ou de nível 3. Os testes estatísticos demonstram que a quantidade de fibrose entre os sub-grupos VIa e VIb não é significativamente diferente, mas ambos apresentam mais tecido conjuntivo do que o grupo II com uma diferença estatisticamente significativa.

Quanto aos mastócitos identificados pela metacromasia ao azul de toluidina, contou-se no sub-grupo VIa uma média de 36,1472 (DP 20,48978) em 10 campos de 100x de aumento e no sub-grupo VIb a média foi de 17,7181 (DP 13,60179). Estes valores não são significativamente diferentes entre si nem da contagem média obtida no grupo II.

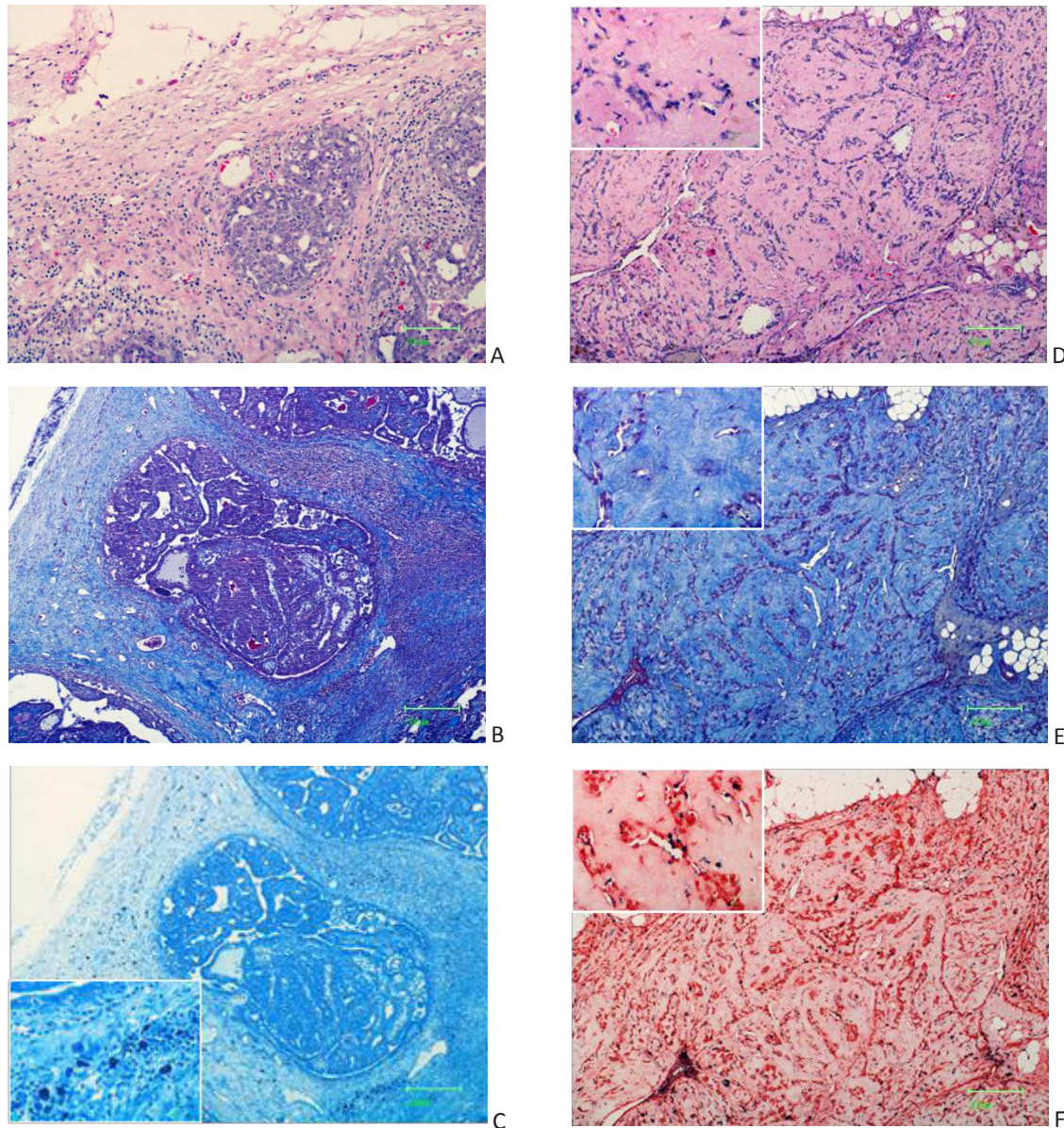


Figura 70 – Histopatologia das neoplasias mamárias do grupo VI. A) Adenocarcinoma cribriforme com elevada quantidade de estroma, (HE, 100x). B) Tecido conjuntivo em destaque onde se observa uma porção com forte infiltração celular, (TM, 50x). C) Metacromasia de mastócitos mostrando grande presença destas células no tecido conjuntivo, em maior detalhe na imagem de pormenor, (AT, 50x e AT, 400x). D) Neoplasia da glândula mamária, do grupo VIb, em fase de remissão composta quase exclusivamente por tecido conjuntivo e algumas células epiteliais, que na imagem de pormenor, têm uma morfologia bem diferenciada com pigmentação intracelular dourada, (HE, 50x e HE, 400x). E) Coloração por tricrômico de Masson, confirmando a natureza conjuntiva do estroma fibroso, (TM, 50x e 400x). F) Coloração especial com azul da Prússia evidenciando a natureza férrica da pigmentação dourada intracelular das células epiteliais, (AP, 50x e 400x).

Na avaliação das neoplasias do grupo VI por imunohistoquímica os resultados foram os seguintes:

A caracterização microscópica da marcação molecular por imunohistoquímica dos tumores do sub-grupo VIa (Tabela 34) revelou que a imunomarcação para o receptor de estrogénio ocorreu em 45% (DP 13,2) das células neoplásicas, tendo sido de intensidade ligeira, ou de nível 1, em 5% (DP 5) das células marcadas e de intensidade moderada, ou de nível 2, em 40% (DP 15,81) das células marcadas. A imunomarcação da proliferação celular foi identificada pelo anticorpo anti-Ki67 em 16,4% (DP 6,4) das células, dos quais 11,2% (DP 7,56) no nível 1 de intensidade e 4,6% (DP 10,29) no nível de intensidade 2. A imunomarcação de apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 revelou que 17,8% (DP 4,66) das células foram positivas com intensidade de marcação ligeira. A imunomarcação de linfócitos T no estroma pelo anticorpo anti-CD3 foi de 38% (DP 34,2) de intensidade moderada, nível 2, e de linfócitos T no parênquima foi de 12% (DP 6,7), igualmente com intensidade moderada. A imunomarcação do estroma pelo anticorpo anti-osteopontina revelou marcação ligeira em 2 preparações (de 5), marcação moderada em 2 preparações (de 5) e marcação forte numa preparação (de 5).

Tabela 34 – Caracterização imunohistoquímica de 5 neoplasias mamárias do sub-grupo VIa.

Anticorpos para imunomarcação	% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Receptor de Estrogénio	45,0000	13,22876	5,0000	5,00000	40,0000	15,81139			
Ki67	16,4000	6,46529	11,2000	8,28855	4,6000	10,28591			
Caspase 3	17,8000	4,65833	17,8000	4,65833					
CD3	Estroma	38,0000	34,20526			38,0000	34,20526		
	Parênquima	12,0000	6,70820			12,0000	6,70820		
Osteopontina (valores absolutos)	Imunomarcação nível 0		Imunomarcação nível 1		Imunomarcação nível 2		Imunomarcação nível 3		
			2		2		1		

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

Tabela 35 – Caracterização imunohistoquímica de 8 neoplasias mamárias do sub-grupo VIb.

Anticorpos para imunomarcação	% de células com imunomarcação		% de células com imunomarcação de intensidade 1		% de células com imunomarcação de intensidade 2		% de células com imunomarcação de intensidade 3		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Receptor de Estrogénio	32,1429	25,79683	6,4286	7,48013	25,7143	26,20887			
Ki67	9,7875	12,48844	0,3750	1,06066	4,6625	5,74678	4,7500	13,43503	
Caspase 3	37,8571	20,38323	29,2857	27,45126	8,5714	15,73592			
CD3	Estroma	16,0000	16,63044			16,0000	16,63044		
	Parênquima	6,6250	3,24863			6,6250	3,24863		
Osteopontina (valores absolutos)	Imunomarcação nível 0		Imunomarcação nível 1		Imunomarcação nível 2		Imunomarcação nível 3		
			2		1		5		

Nota – os valores ausentes equivalem a zero. DP – Desvio Padrão.

A caracterização microscópica da marcação molecular por imunohistoquímica dos tumores do sub-grupo VIb (Tabela 35) revelou que a imunomarcação para o receptor de estrogénio ocorreu em 32,1% (DP 25,7) das células, tendo sido de intensidade ligeira, ou de nível 1, em 6,43% (DP 7,48) das células marcadas e de intensidade foi moderada, ou de nível 2, em 25,7% (DP 26,2) das células marcadas. A imunomarcação da proliferação celular foi identificada pelo anticorpo anti-Ki67 em 9,78% (DP 12,48) das células, de intensidade ligeira em 0,38% (DP 1,06) e de intensidade moderada em 4,67% (DP 5,57). A imunomarcação de apoptose pelo anticorpo anti-caspase 3 revelou que 37,86% (DP 20,39) das células foram positivas com intensidade de marcação ligeira em 29,2% (DP 27,45) e de intensidade moderada em 8,57% (DP 15,74). A imunomarcação de linfócitos T no estroma pelo anticorpo anti-CD3 foi de 16% (DP 16,63) de intensidade moderada, nível 2, e de linfócitos T no parênquima foi de 16,6% (DP 3,25) igualmente com intensidade moderada. A imunomarcação do estroma pelo anticorpo anti-osteopontina revelou marcação ligeira em 2 preparações (de 6), marcação moderada numa preparação (de 6) e marcação forte em 5 preparações (de 6).

Os testes estatísticos de comparação entre os sub-grupos VIa e VIb e os restantes grupos resultaram na identificação de diferenças estatisticamente significativas que se mencionam em seguida. A imunomarcação pelo anticorpo anti-receptor de estrogénio é menor no sub-grupo VIb do que no grupo II. A imunomarcação da proliferação celular pelo anticorpo anti-Ki67 é maior no sub-grupo VIa, relativamente ao grupo II, mas entre o sub-grupo VIb e o grupo II não há uma diferença estatisticamente significativa. A detecção de apoptose por imunohistoquímica com o anticorpo-anti-caspase 3 é mais prevalente no sub-grupo VIb do que no sub-grupo VIa e, em ambos os sub-grupos, há mais células marcadas por este anticorpo do que no grupo II. Na identificação de linfócitos T pelo anticorpo anti-CD3, não se verificam diferenças quanto à sua prevalência no estroma ou no parênquima. A imunomarcação forte, de nível 3, é mais acentuada no sub-grupo VIb relativamente ao grupo I, mas não é estatisticamente diferente do sub-grupo VIa, apesar de ser mais prevalente.

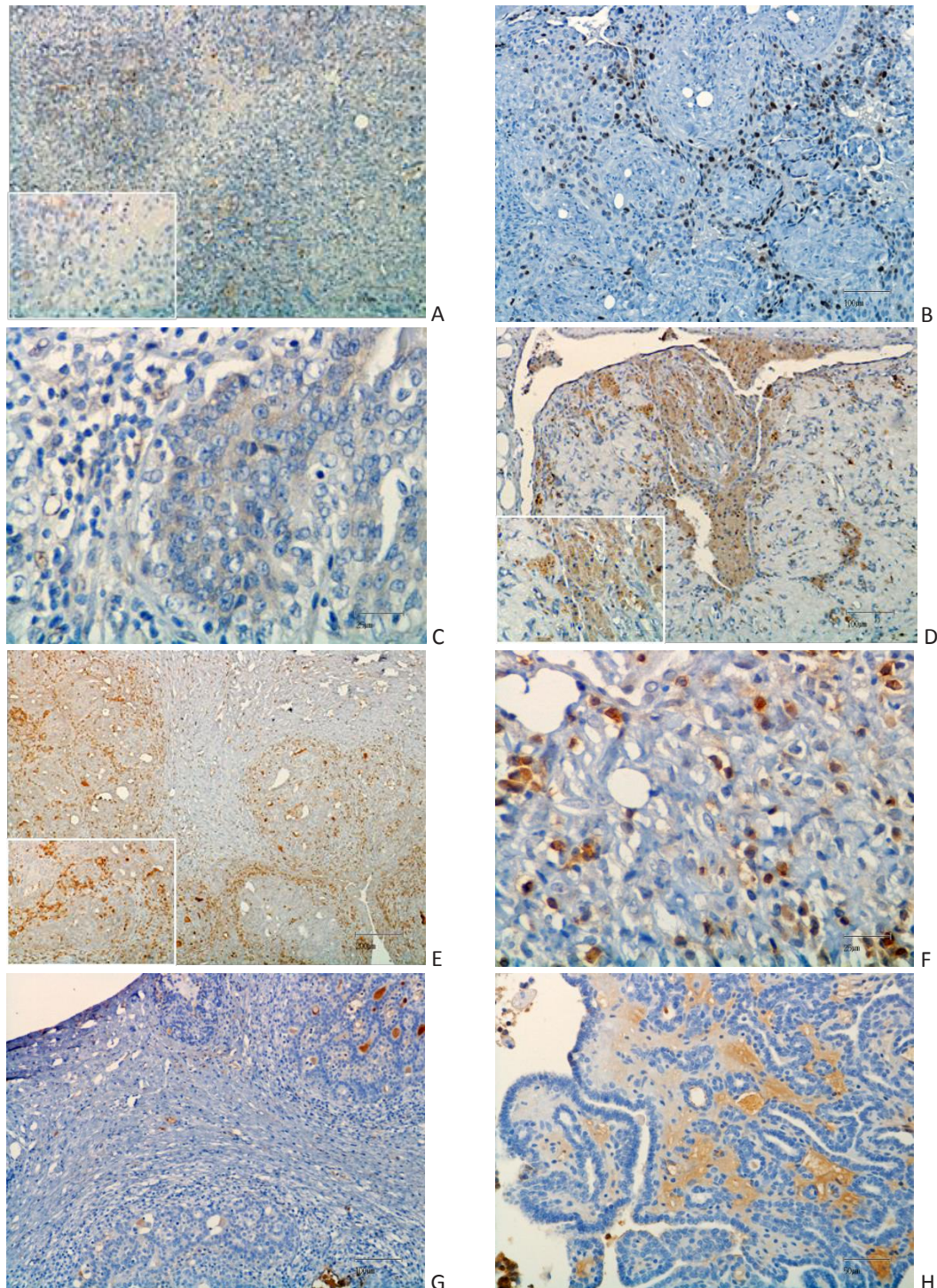


Figura 71 – Caracterização imunohistoquímica do grupo VI. A) Imunomarcacão para o receptor de estrogénio onde se observam uma baixa percentagem de células positivas, detalhe ampliado com algumas células positivas (x100 e x400). B) Células em proliferaçao marcadas pelo anticorpo anti-Ki67 com distribuicão principalmente no estroma tumoral (100x). C) Células em apoptose marcadas pelo anticorpo anti-caspase 3 do sub-grupo VIa (x400) e D) sub-grupo VIb onde se observa um pormenor ampliado com imunomarcacão de intensidade 2, (100x e 400x). E) Linfócitos T positivos por imunomarcacão pelo anticorpo anti-CD3 do sub-grupo VIa com localizaçao maioritariamente no estroma tumoral, pormenor ampliado com clara visibilidade dessa distribuicão, (50x e 200x). F) Linfócitos T positivos para imunohistoquímica anti-CD3 do sub-grupo VIb, (400x) G) e H) estroma tumoral com marcaçao pelo anticorpo anti-osteopontina de nível I no sub-grupo VIa e nível 3 no sub-grupo b, respectivamente, (100x e 200x).

Discussão

Capítulo V

1. Caracterização da glândula
mamária normal – 159

2. Caracterização do modelo experimental –
164

3. Caracterização da termoterapia
focal – 168

Caracterização da terapia complementar –
171

Capítulo V

Discussão

O trabalho de investigação apresentado nesta dissertação partiu do interesse em aprofundar o conhecimento relacionado com as terapêuticas emergentes em oncologia humana e veterinária, nomeadamente na área das neoplasias da glândula mamária. Neste âmbito, o desencadeamento de imunidade anti-tumoral em animais imunocompetentes na sequência da aplicação de hipertermia focal estava em curso em melanoma de murganho [396, 411] e a equipa e as instituições envolvidas implementaram um desenho experimental semelhante para neoplasias da glândula mamária de rato induzidas com DMBA que a autora assumiu desenvolver com vista à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde. A indução de diferenciação celular em células neoplásicas pouco diferenciadas num modelo rústico de oncogénese como aquele que se escolheu foi, primeiramente, muito reflectido, mas a escassez de publicações relacionadas em modelos *in vivo*, alargou o âmbito deste trabalho de investigação.

1. Caracterização da glândula mamária normal

Os animais do grupo I tiveram um desenvolvimento homogéneo ao longo de todo o período experimental de 27 semanas e foram sacrificados com 34 semanas de idade, ou seja na fase de jovens adultos [412, 413]. O peso médio de 277,876 g e o desvio padrão de 3,534g indicam que o desenvolvimento foi homogéneo e decorreu dentro dos parâmetros fisiológicos normais [413].

Na análise laboratorial aos parâmetros de hemograma e bioquímica sérica os valores de referência para ratos fêmea de 17 semanas ou mais semanas de idade foram entendidos como indicativos, já que se basearam num N com cerca de 150 animais de idade heterogénea, acima de 17 semanas, mantidos num laboratório de referência [395], como tal outras publicações foram consideradas na interpretação global dos valores laboratoriais obtidos [413, 414]. Em comparação com o intervalo de referência, o resultado dos parâmetros analisados em cada animal foi entendido como normal se estivesse dentro dos limites normais, como diminuídos se fossem valores inferiores ao limite mínimo ou, por outro lado, aumentados se os valores obtidos fossem superiores ao limite máximo do intervalo de referência.

Uma breve abordagem à pertinência de alguns parâmetros faz-se de seguida com base bibliográfica [413-422]. A quantidade de eritrócitos por ml tem valores de referência característicos para cada espécie. Se diminuídos, o animal está em anemia por perda por hemorragia interna ou externa, consumo por hemólise intravascular ou extravascular ou por aplasia medular, se aumentados considera-se uma situação de

policitémia que pode ser verdadeira (*vera*), ou relativa no caso da componente plasmática do sangue estar diminuída como em casos de desidratação. As variações de hematócrito, que é a percentagem de eritrócitos numa coluna de sangue total, seguem as considerações efectuadas para os eritrócitos. O volume globular médio mede o volume médio dos eritrócitos e é um valor que também varia conforme a espécie. Se aumentado significa que as células eritrocitárias são maiores, ou seja que há uma quantidade aumentada de células precursoras como reticulócitos ou eritroblastos. O volume corpuscular médio, que é o quociente entre o hematócrito e o VGM segue a mesma tendência de variação desses parâmetros. A quantidade de hemoglobina está relacionada com a quantidade de eritrócitos e com o ferro disponível para formação do grupo heme. A hemoglobina corpuscular média está diminuída se a quantidade de ferro for limitada ou se o VGM estiver aumentado.

A quantidade de leucócitos avalia a quantidade total de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Como tal, mais importante do que o valor da quantidade total de células brancas é conhecer a quantidade dos distintos tipos celulares, já que cada um está relacionado com reacções imunitárias e inflamatórias mais ou menos características. Abreviadamente, em caso de inflamação aguda, os neutrófilos estão aumentados, em especial se a origem for bacteriana. Se a etiologia foi parasitária ou alérgica, os eosinófilos estão aumentados, podendo estar ou não acompanhados pelo aumento de basófilos e no caso das inflamações crónicas verifica-se um aumento dos mononucleares, linfócitos e monócitos. As infecções víricas causam, tipicamente, um aumento dos linfócitos, apesar da existência haver vírus citolíticos. Quando as inflamações são crónicas activas, uma conjugação destas variações pode ser encontrada no leucograma.

A glicémia mede os níveis séricos de glicose e pode estar aumentada em situações como ausência ou diminuição das células beta dos ilhéus pancreáticos o que resulta numa diminuição da síntese de insulina. Esta hormona promove a entrada intracelular da glicose mediada por um transportador. Uma glicémia diminuída estimula a hiperglucagonémia com subsequente mobilização das reservas de glicogénio. As catecolaminas e o cortisol promovem a glicogenólise e a gluconeogénese resultando numa hiperglicémia transitória [416, 420].

A bilirrubina total é a soma da bilirrubina indirecta, ou não-conjugada, com a bilirrubina directa, ou conjugada. A degradação dos grupos heme, presentes na hemoglobina, mioglobina e citocromos, origina biliverdina e seguidamente bilirrubina não conjugada que é transportada no sangue até ao hepatócito em acoplamento com albumina sérica [417]. No hepatócito passa por um processo de conjugação com o ácido glucorónico o que permite a passagem para bilirrubina conjugada, sendo depois excretada pela bÍlis para o intestino [417]. A elevação de bilirrubina indirecta pode estar relacionada com um aumento da degradação do grupo heme ou com uma diminuição da funcionalidade dos hepatócitos enquanto um aumento da bilirrubina directa poderá estar relacionado com uma diminuição da excreção biliar.

As enzimas consideradas na analítica foram a ALT, AST, fosfatase alcalina e LDH. A integridade dos hepatócitos é avaliada, em clínica laboratorial, pela medição das enzimas ALT e AST. A ALT é uma enzima citosólica, apesar de também estar presente nas células musculares. A AST hepática tem localização mitocondrial e citoplasmática, apesar da sua existência em células musculares cardíacas e esqueléticas e em eritrócitos [416, 417]. A elevação destas enzimas não é totalmente específica de lesão hepatocitária, mas está-lhe fortemente correlacionada.

A LDH está presente em muitos tecidos como fígado, músculo, eritrócitos, entre outros e não deve ser considerada específica do fígado [416, 417], deste modo a sua elevação ocorre após lesão celular de qualquer um dos tecidos onde exista. A fosfatase alcalina é uma enzima associada à membrana dos hepatócitos, e de outras células como osteoblastos, e aparece aumentada no plasma se a sua actividade estiver aumentada, por exemplo por aumento da função osteoblástica ou por aumento de corticosteróides [416, 417].

Quanto à creatinina sabe-se que o seu valor é muito pouco influenciado por factores extra-renais, estando aumentada em caso de diminuição da filtração glomerular, o que também se repercute na retenção simultânea de ureia, identificadas conjuntamente como urémia renal [416, 421]. Quando o valor de creatinina é normal e o de ureia está aumentado, a urémia diz-se pré-renal e deve-se a um aumento da degradação de proteína de origem endógena ou exógena [416, 421]. A urémia pós-renal não será considerada nesta discussão.

As proteínas totais são compostas maioritariamente por imunoglobulinas e albumina e estão diminuídas em situações de enteropatia com perda de proteína, onde a perda proteica é não-selectiva ou por nefropatia com perda de proteína, na qual há sobretudo uma diminuição de albumina. A hipoproteinémia pode ainda ocorrer por *deficits* alimentares, situações de maldigestão e malabsorção ou por excesso de consumo como em casos de parasitismo extremo. Um aumento relativo de proteínas totais pode ocorrer por desidratação, ao passo que um aumento absoluto dever-se-á a um excesso de síntese de imunoglobulinas.

Em todos os parâmetros os valores do intervalo de referência publicados são indicativos e o valor médio do grupo I serve de referência para a comparação com os restantes grupos. Esta opção é preferível do que a comparação directa com os valores do intervalo de referência da bibliografia [419]. Ainda assim, neste estudo o grupo controlo foi formado por seis animais o que dá origem a valores médios com um desvio padrão eventualmente elevado, pelo que importa integrar todos os factores relacionados com o parâmetro em avaliação.

Consideram-se agora os valores obtidos das análises hematológicas e bioquímicas do grupo controlo (Tabela 19, pág. 117).

Na análise da linha eritrocitária do hemograma, o número de eritrócitos está ligeiramente diminuído face ao intervalo de referência do laboratório Charles River [395], no entanto outras publicações da especialidade [414] usam intervalos de referência mais amplos para este parâmetro que vão de $5-10 \cdot 10^6/\text{ml}$ [414], o mesmo acontece para a hemoglobina e hematócrito. Apesar deste desfasamento, decidiu-se manter o intervalo de referência inicial [395] por ser mais exigente e adequado ao género e idade dos animais em análise, mas, por outro lado, manteve-se a flexibilidade necessária para admitir outras referências sempre que fosse pertinente.

Os valores dos parâmetros da bioquímica sérica também indicam alguns desvios relativamente ao intervalo de referência, o que acontece no caso dos triglicéridos, ureia e creatinina, cálcio total, bilirrubina directa (ou conjugada), bilirrubina indirecta (ou não-conjugada) e albumina. A ureia e a creatinina estão aumentadas, mas o seu aumento é inferior ao dobro do limite máximo de normalidade, pelo que não indica doença renal, mas antes um aumento endógeno do consumo de proteínas musculares, provavelmente devido a alguma agitação e actividade física a que os animais foram expostos [416]. A bilirrubina total está dentro do intervalo de referência, no entanto a bilirrubina indirecta está ligeiramente aumentada ao passo que a bilirrubina directa está ligeiramente diminuída. Estas diferenças não foram entendidas como relevantes, uma vez que as transaminases hepáticas AST, ALT e FA estão dentro dos valores de referência e, para além dos animais se apresentarem clinicamente saudáveis, todos os órgãos, incluindo o fígado, foram avaliados e considerados normais por histopatologia, apesar desses resultados não constarem desta dissertação. Da mesma forma, o cálcio e os triglicéridos estão alterados, relativamente aos valores do intervalo de referência, mas o restante estado geral e a homogeneidade do grupo justifica que se considere este desvio como parte da variabilidade das estirpes não-isogénicas e da variabilidade relacionada com as condições de manutenção bem como com os aparelhos de medição.

A macroscopia e a microscopia da glândula mamária corresponde às características anatómicas e histológicas referenciadas na bibliografia [138, 188, 190, 191]. A pigmentação dourada no citoplasma das células luminais foi positiva à coloração azul da Prússia, pelo que se conclui tratar-se de uma acumulação férrica, considerada normal para estas células [1, 423]. Este pigmento poderia ainda ser originário de lípidos complexos, mas as colorações diferenciais para substâncias álcool-ácido-resistentes, Ziehl Neelsen, e a coloração para carboidratos neutros que se complexam com lípidos, PAS, foram ambas negativas.

A semiquantificação do tecido conjuntivo presente na glândula mamária normal foi muito homogénea, tendo este resultado valor comparativo para os restantes grupos que não receberam indução neoplásica.

Segundo Russo & Russo [138], as células epiteliais transformadas atraem números crescentes de mastócitos desde as fases iniciais de proliferação intraductal até à constituição da neoplasia e há um acompanhamento do número de linfócitos, fibroblastos, proteoglicanos e fibras de colagénio que, por sua vez, facilitam a proliferação, desmoplasia e angiogénese [424]. Mesmo havendo duas subpopulações de mastócitos numa neoplasia estabelecem-se interações com células do sistema imunitário e com fibroblastos que podem culminar na síntese de colagénio desmoplásico, ao passo que a fibrose cicatricial não apresenta a infiltração de mastócitos [135, 138-140].

A contagem média de mastócitos foi determinada para os animais adultos em estudo, no entanto a escassa literatura sobre o tema [425, 426] aborda ratos-fêmeas em desenvolvimento ou gestantes e lactantes ou ainda outras espécies como os murganhos, pelo que não se tem um ponto de referência com as mesmas especificidades do grupo em estudo, no entanto do que está descrito na literatura [138], a metodologia e os resultados obtidos são próximos, entendendo-se então como um ponto de referência para a comparação com os restantes grupos.

A avaliação das células marcadas por imunohistoquímica não segue uma metodologia consensual. Na maioria das publicações, a avaliação quantitativa ou semiquantitativa depende do anticorpo usado, da experiência do investigador e de factores relacionados com o próprio tecido em avaliação [427]. Alguns esforços têm sido feitos para uniformizar os limites percentuais de imunomarcção considerados na semiquantificação no entanto, existem algumas divergências entre as principais associações europeias e americanas que emitem linhas de orientação [397, 427-430]. No estudo dos marcadores por imunohistoquímica em neoplasias da glândula mamária de rato os métodos têm sido baseados na medicina humana, mas na ausência de linhas de orientação consensuais para a avaliação semiquantitativa, optou-se neste trabalho por manter o valor percentual da observação de 100 células de uma área representativa do tumor em 10 campos de grande aumento (400x), tendo em conta a intensidade de imunomarcção, sem efectuar uma semiquantificação em níveis, o que poderia desviar os resultados finais sobretudo quando se pretendessem efectuar comparações entre os grupos. Por outro lado, este método permitiu que todos os anticorpos com imunoreactividade celular fossem quantificados pelo mesmo critério independentemente do tecido ser histológico ou neoplásico.

A caracterização imunohistoquímica da glândula normal do rato (Tabela 20, pág. 120) é original na literatura para este conjunto de imunomarcadores. Em todos os anticorpos, a imunoreactividade teve a distribuição esperada em termos da localização celular. Os resultados confirmam a relação funcional das células luminais com dependência hormonal do estrogénio e a escassa proliferação celular em células bem diferenciadas. A localização da HSP70 em células quase exclusivamente basais, ou seja, mioepiteliais, na glândula mamária do rato é um resultado que não está descrito na literatura. Há, no entanto uma publicação que refere esta localização na glândula parotídea em humanos [431] e duas publicações que abordam a caracterização da HSP70 em tecidos mamários histológicos, mas de cadela [409, 432], sendo que nesta espécie a localização é luminal e basal. A imunomarcção de linfócitos T localiza-os exclusivamente no estroma, do mesmo modo que é referido na literatura [138]. A escassa presença de osteopontina na glândula mamária histológica é também previsível uma vez que as células do estroma estão diferenciadas no sentido fibroblástico.

A caracterização por imunohistoquímica do grupo I para os imunomarcadores descritos têm valor comparativo com os restantes grupos que não receberam indução neoplásica.

2. Caracterização do modelo experimental

O rato é considerado um animal ideal para investigação em oncologia e toxicologia da glândula mamária [1, 138, 358] já que desenvolve um número diminuto de tumores o que evita a morte prematura [358]. Para além disso, as neoplasias que desenvolvem, reflectem os estadios sucessivos da carcinogénese. O modelo experimental para o estudo das neoplasias da glândula mamária por carcinogénese química com DMBA é considerado pouco sofisticado e, também por isso, muito usado [138, 193, 358, 372, 374], permitindo estudar a iniciação [392], promoção, progressão [433] e também factores de prevenção [367, 381, 391, 434].

No modelo em rato há características bem estabelecidas e concordantes entre os diversos estudos, como a dependência hormonal de estrogénio, a influência da idade no momento da indução por DMBA, a dieta e a variabilidade genética [138, 193, 194, 210, 392]. Quanto à influência da dose usada, a maioria dos estudos usa 20mg/animal por gavagem intragástrica no período de susceptibilidade entre 45-60 dias [138, 385, 435]. Nestas condições, a taxa de indução descrita varia entre os 50-100% [138, 385]. Há ainda estudos oncológicos por indução de DMBA com doseamento em função do peso do animal e as doses descritas na literatura vão desde 5mg/Kg [194, 210] a 100mg/Kg [391]. A não padronização da dose em função do peso torna problemática a comparação dos resultados quanto ao rendimento de indução e o tempo de latência, entendido como o tempo que decorre entre a administração do carcinogénio e a detecção por palpação do primeiro tumor.

No estudo que aqui se apresenta, a dose de DMBA usada foi de 65mg/Kg, tem por base a experiência anterior do grupo de trabalho no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra [363, 367]. O rendimento de indução obtido foi de 75%, o que está de acordo com a literatura [138, 385]. O tempo de latência e a curva de crescimento das neoplasias não foram registados porque entendeu-se que não acrescentavam informação relevante para o trabalho, para além de que tanto a manipulação minuciosa das glândulas mamárias como a medição semanal dos tumores nos três eixos ortogonais causariam agitação desnecessária aos animais, sendo que o rigor desses dados também não estaria assegurado.

Considerámos importante preceder a uma caracterização criteriosa dos grupos que compuseram o desenho experimental, em especial do grupo que recebeu indução neoplásica, já que permite comparar o efeito dos tratamentos aplicados aos grupos com indução neoplásica semelhante. Neste âmbito a análise macroscópica e microscópica por histopatologia e por imunohistoquímica foi meticulosa. Entre os procedimentos adoptados esteve a semiquantificação das características analisadas em articulação com a avaliação clássica dos tumores por histopatologia.

A literatura [175] refere que há uma assimetria esquerda-direita no desenvolvimento de neoplasias mamárias em humanos e murganhos com indução neoplásica por DMBA onde se verificam mais neoplasias na cadeia mamária esquerda do que na cadeia mamária direita, sem nenhuma explicação conhecida. Em rato não se encontraram publicações com referência a esta assimetria. No estudo efectuado verificou-se existir uma assimetria entre a cadeia mamária esquerda e a direita, tendo-se desenvolvido mais tumores na cadeia

mamária direita com uma diferença de cerca de 10%. Relativamente à disposição anatómica no sentido craneal-caudal, sabe-se que os TEB são unidades iniciais de desenvolvimento e ramificação da estrutura tubulo-alveolar que caracteriza a glândula mamária, sendo que no período de maior proliferação celular, 45-60 dias, são muito susceptíveis a carcinogénios iniciadores como o DMBA [138, 371, 377].

Conhece-se também que há um gradiente decrescente no número de TEBs desde as glândulas mamárias cervicais às inguinais e que, por isso mesmo, os protocolos de indução neoplásica têm um rendimento de indução superior nas glândulas com mais TEBs, ou seja nas cervicais e torácicas [138, 175, 193, 384]. Esta distribuição gradual também se verificou neste trabalho, o que indica a reprodutibilidade do protocolo.

Quanto à avaliação entre as variáveis peso, volume e grau tumoral, verificou-se que o peso e o volume estavam correlacionados, o que não surpreende já que tumores maiores contribuem, à partida, positivamente para o peso final. A relação directa entre o volume e o grau também é previsível, porque tumores, ditos mais malignos, ou seja de maior grau tumoral, têm maior índice proliferativo, anaplasia mais acentuada maior estimulação angiogénica e, como tal, um crescimento mais descontrolado [36, 228, 436]. Não obstante os animais com tumores de grau III, *a priori* mais volumosos, tiveram menor peso médio. As neoplasias mais malignas causam caquexia fazendo com que, mesmo em tumores muito volumosos, o peso do animal diminua [437, 438].

Neste estudo verificou-se também que a regularidade da forma e a tonalidade branco-acinzentado estão relacionadas com tumores de grau I, o que reflecte o tipo de crescimento mais lento e homogéneo em oposição aos tumores de grau II e III onde surgem formas mais irregulares, com neovascularização mais caótica e mais susceptível a hemorragias [47, 245].

Estes dados são relevantes para trabalhos futuros de comparação e para a validação deste modelo experimental em estudos que visam a transposição para espécies de interesse clínico.

A compartimentação dos tumores em categorias dispostas pelo potencial maligno, ou grau, foi um grande avanço para a patologia oncológica porque permitiu, a partir daí, comparar resultados entre os mais variados estudos [199, 436, 439-442]. No entanto, a variabilidade dos tumores dentro de cada grau é ainda muito grande dificultando, em parte, a comparação entre os estudos oncológicos e a projecção do seu comportamento biológico. Assim sendo, a abordagem semiquantitativa de outros parâmetros histopatológicos com relevância em medicina humana e veterinária é pertinente em patologia experimental. O presente trabalho é original na aplicação da PCA, um método que permite efectuar uma análise profunda de dados originados de múltiplos parâmetros microscópicos, a neoplasias da glândula mamária induzidas por DMBA. A aplicação desta análise aos parâmetros avaliados revelou tendências de correlação que estão agora matematicamente confirmadas. Algumas eram já conhecidas como por exemplo a relação entre a secreção e o comportamento benigno, o que não surpreende já que a secreção de leite pelas células epiteliais da glândula mamária ocorre quando estão plenamente diferenciadas, daí que a sua presença seja entendida como um elemento que reporta a um estado de preservação da diferenciação celular, logo com menor anaplasia e menor capacidade de proliferação, invasão e metastização. Da abordagem efectuada verifica-se que a heterogeneidade dos tumores, baseada no número de padrões histológicos, não é um parâmetro relevante.

Este resultado contraria a análise simples da distribuição de frequências (Tabela 21, pág. 128) de onde parece haver uma relação directa entre o número de padrões histológicos e a malignidade tumoral, também discutida por Costa, 2002 [210].

A preponderância do padrão cribriforme é importante para distinguir malignidade, sendo um factor potencial de discriminação influenciado pelo número de mitoses. Por exemplo, para dois tumores do mesmo grau e com a mesma preponderância de padrão cribriforme, a contagem de mitoses discrimina-os no sentido de valorizar a malignidade do que apresentar mais mitoses, relativamente ao outro. A valorização do padrão cribriforme está implicitamente contemplada no cálculo do grau nuclear na medida em que se calculam as áreas bem diferenciadas, ou seja as áreas tubulares. Sendo a estrutura cribriforme formada por células, *a priori*, menos diferenciadas e portanto opostas a essa apreciação, intuía-se a orientação maligna desse padrão. Com esta análise por PCA fica comprovada a sua relação com o comportamento tumoral e ainda se discriminam os tumores com mais mitoses o que, no grau nuclear também se avalia, mas dentro de parâmetros rígidos de semiquantificação. Da mesma forma a necrose é influente nos tumores com aspecto de comedocarcinoma e em outros tipos estruturais, em especial no padrão tubular.

A hemorragia segue a mesma valorização que a presença de necrose. Em conjunto discriminam tumores do mesmo grau, em especial se formados pelos padrões mais bem diferenciados. Estes achados explicam-se por exemplo com base na neovasculatura das neoplasias. Se os neovasos forem caóticos, naturalmente que a oxigenação estará comprometida e aparecem necroses e hemorragias com maior frequência do que no caso dos neovasos serem mais aproximados da normalidade funcional. A angiogénese é influenciada por muitos factores pro-angiogénicos e anti-angiogénicos (Tabela 3, pág. 43) que se relacionam com a actividade das células neoplásicas e das células do microambiente tumoral, por exemplo, pelo recrutamento de células derivadas da medula óssea com actividade angiogénica ou pela estimulação das células locais na proliferação da vasculogénese. Nas neoplasias da glândula mamária com padrão tubular, logo formado por células relativamente bem diferenciadas, há uma heterogeneidade dinâmica que pode alterar-se e induzir a formação de vasos e capilares sanguíneos e linfáticos aberrantes, para além de poderem também adquirir fenótipos favorecedores de transição epitélio-mesenquimatosa com vantagens para a invasão e metastização. Assim, a necrose e a hemorragia são elementos de valorização teórica, e agora comprovada, de discriminação entre tumores relativamente bem diferenciados pertencentes ao mesmo grau tumoral. Esta análise poderia ser caracterizada em termos moleculares, por exemplo, por um perfil de expressão génica para identificar e quantificar as moléculas associadas aos tumores com necrose e hemorragia.

Algumas publicações [135, 138-140, 426] referem que os mastócitos são recrutados por sinalização iniciada nas células epiteliais neoplásicas e que, depois de infiltrados no estroma tumoral, estão directamente implicados na estimulação de desmoplasia e na quimiotaxia de linfócitos para o tumor, assim sendo é pertinente avaliar os mastócitos e a quantidade de estroma em cada tumor. A avaliação semiquantitativa do estroma pela coloração TM revelou que há uma variabilidade muito acentuada quanto à prevalência de tecido conjuntivo nas neoplasias e que grande parte desse tecido conjuntivo está fortemente infiltrado por mastócitos (Figura 61, pág. 131). Em tumores malignos da mama em humanos, esta relação está bem estabelecida e

pensa-se que a desgranulação dos mastócitos inibe a proliferação das células epiteliais neoplásicas por mecanismos indirectos que envolvem a heparina e os fibroblastos [443], contudo os mastócitos do rato não desgranulam [139] e desconhece-se se este mecanismo está presente nestas neoplasias. Contudo a evidente associação entre a distribuição dos mastócitos nas áreas de tecido conjuntivo sugere que os tumores induzidos por DMBA desencadeiam a sinalização celular conducente ao recrutamento de mastócitos e desmoplasia. Estes elementos descritivos servem de referência para este e para outros trabalhos que venham a utilizar o mesmo modelo experimental.

A caracterização molecular por imunohistoquímica (Tabela 25, pág. 132) revela que os tumores induzidos por DMBA estão de acordo com as premissas teóricas no que respeita à dependência hormonal do estrogénio pelas células luminais [138, 190].

A proliferação celular nestas neoplasias tem uma percentagem dependente do grau tumoral e a sua prevalência está de acordo com a experiência do grupo de trabalho [367].

A imunomarcação da HSP70 em contexto neoplásico é consideravelmente diferente do tecido mamário histológico, já que a imunomarcação ocorre maioritariamente nas células epiteliais, morfológicamente mais próximas das células poliédricas tipo-luminal. Esta constatação é coerente com a imunomarcação efectuada em neoplasias de cadela [409, 432] e em humanos [444], o que faz deste modelo uma boa escolha para avaliar experimentalmente a termoterapia. O trabalho realizado é um avanço para a caracterização deste marcador em neoplasias mamárias de rato induzidas por DMBA já que o número de publicações em modelos com rato é reduzido.

A presença de linfócitos T em localização intratumoral faz prever alguma imunogenicidade por parte das células neoplásicas com resposta pelo sistema imunitário adaptativo. Desconhece-se no entanto, de que modo esta imunidade dá origem a uma resposta citotóxica ou humoral, sendo pertinente no futuro efectuar imunomarcação para linfócitos B activados com BAX5 e também perfis de expressão génica que, eventualmente, poderiam elucidar acerca da sinalização celular associada a estes linfócitos T. A descrição da prevalência destas células imunitárias, mais do que precisarem de uma explicação, são um ponto de partida importante para a comparação dos efeitos imunológicos locais desencadeados pelos protocolos terapêuticos utilizados neste estudo. Da mesma forma, a imunoreactividade com a osteopontina tem um valor comparativo muito útil com o grupo VI.

Os parâmetros avaliados neste estudo caracterizam em pormenor as neoplasias de rato induzidas por DMBA e, apesar de nem todos os dados descritos estarem reportados na literatura da patologia experimental, estes elementos constam de muitos trabalhos publicados em oncologia humana [18, 179, 344, 410, 444, 445] e veterinária [6, 7, 35, 37, 176, 198, 199, 227, 446, 447] com características semelhantes ao rato, o que faz deste modelo um ponto de partida para a avaliação de terapêuticas oncológicas como a termoterapia focal e a diferenciação celular por vitamina D e dexametasona.

3. Caracterização da termoterapia focal

3.1. Caracterização dos efeitos locais e sistêmicos da inoculação de cimento em animais sem indução neoplásica

A biocompatibilidade do biomaterial ferrimagnético utilizado no protocolo de termoterapia focal foi avaliada por inoculação em tecido mamário normal de rato. A inoculação foi efectuada uma semana antes do sacrifício e, durante esse período de tempo, os animais mantiveram os mesmos padrões comportamentais e fisiológicos nomeadamente o peso numa variação semelhante à do grupo controlo.

A avaliação da clínica laboratorial evidenciou alterações relevantes em parâmetros relacionados com a resposta imunitária, sendo esse o caso dos linfócitos e dos neutrófilos. Apesar dos neutrófilos terem tido uma contagem dentro do intervalo de referência, o teste de comparação entre os grupos I e III revelou uma diferença estatisticamente significativa. O aumento conjunto de linfócitos e de neutrófilos está relacionado com a presença de inflamação crónica activa [416], como é o caso da reacção granulomatosa que envolve o cimento (Figura 63, pág. 136). Ainda dentro das considerações acerca dos testes comparativos, as plaquetas estavam elevadas no grupo III embora dentro do intervalo de referência, pelo que é considerada fisiológica. A diminuição ligeira do cálcio, ver-se-á adiante, que é transversal a todos os grupos deste estudo, pelo que se considera uma variação fisiológica.

O valor médio dos restantes parâmetros estava dentro do intervalo de referência, sem variação significativa com o grupo controlo, grupo I. Estes resultados demonstram que o biomaterial inoculado foi muito bem tolerado pelos animais em estudo não tendo causado alterações detectáveis nos parâmetros avaliados pela clínica laboratorial.

A avaliação macroscópica revelou a formação de uma cápsula conjuntiva em várias fases de evolução, o que é compatível com um processo cicatricial recente [448].

A caracterização histopatológica confirmou a formação de fibroplasia com HE e TM. Em nenhum caso se registaram alterações tecidulares no tecido mamário envolvente nem nos restantes órgãos metabólicos como o rim, fígado ou pulmão, apesar desses dados não constarem detalhadamente desta dissertação. Uma curiosidade desta avaliação prende-se com a relativa escassez de mastócitos neste processo cicatricial fisiológico. Esta observação reforça a relação teoricamente já estabelecida entre as células neoplásicas, os mastócitos e a desmoplasia, ao passo que a cicatrização fisiológica, independente de processos neoplásicos, carece quase totalmente da infiltração de mastócitos.

A caracterização molecular por imunohistoquímica revelou a presença de um número aumentado de linfócitos CD3+ no tecido cicatricial no entanto, fazendo estas células parte integrante do tecido de granulação [448], não serão alvo de considerações mais profundas.

Num cômputo geral pode afirmar-se que o cimento composto quimicamente por nanopartículas ferrimagnéticas é biocompatível com o rato. No trabalho de Portela et al. [396] esta conclusão também foi tirada para murganho.

3.2. Caracterização dos efeitos tecidulares da termoterapia focal em neoplasias da glândula mamária

O grupo V foi formado por animais que até ao sacrifício não mostraram diferenças significativas relativamente ao grupo II no que ao peso diz respeito. O rendimento de indução neoplásica, a macroscopia e a histopatologia das neoplasias seguiu o mesmo padrão de prevalência quanto às características avaliadas, o que reflecte a reprodutibilidade do protocolo de indução, sendo este um paradigma fundamental de qualquer investigação, o que permite concluir que a execução de toda a metodologia foi cumprida e que os aparelhos e procedimentos estavam padronizados e foram correctamente manipulados.

Um aspecto muito relevante de todo processo que envolveu a termoterapia focal foi a manutenção do bem-estar animal e dos parâmetros fisiológicos após os ciclos hipertérmicos. Mais ainda, a dimensão das neoplasias tratadas e não-tratadas diminuiu visivelmente, apesar de não ter sido monitorizada em termos quantitativos porque o fosse de interesse foi a avaliação microscópica.

Na avaliação histopatológica dos tumores tratados verificou-se que havia uma presença mais acentuada de necrose e de hemorragia do que nos tumores do grupo II. Os tratamentos hipertérmicos foram monitorizados por câmara de termografia no sentido de manter a temperatura local do tumor entre 38 e 43°C. Não obstante não se pode desprezar a imprevisibilidade relativamente à importância da heterogeneidade tumoral, da neovasculatura e de outros factores relacionados com a difusão térmica. É, por isso, sensato contemplar a possibilidade de momentaneamente se ter excedido o intervalo hipertérmico com desencadeamento de consequências próprias da termoablação como a necrose e a hemorragia [260] [151, 241, 242, 247, 259, 262, 272].

A contagem de mastócitos no grupo V revelou grande semelhança com o grupo II. Este resultado indica-nos que as células epiteliais neoplásicas, dos tumores tratados e não-tratados do grupo V, são semelhantes às do grupo II, relativamente à interacção com os mastócitos e, por outro lado, que a hipertermia focal não interfere com o seu estado de granulação, indicando que o protocolo utilizado é seguro relativamente a estes parâmetros. Este resultado é um estímulo para que este tratamento seja considerado no desenho experimental em outras espécies.

A termoterapia focal causa um sobreaquecimento dos tecidos neoplásicos sem afectar, ou afectando minimamente, as células normais [155, 244]. No entanto, o estroma é o meio físico de dissipação do calor e praticamente não há dados acerca da sua evolução após os tratamentos hipertérmicos [155, 240, 242, 247, 262]. Uma vez que o processo hipertérmico desencadeia uma reacção local, por um lado de cicatrização consequente aos danos tecidulares, e o por outro por estimulação de APCs, entre as quais macrófagos, que estimulam secundariamente os fibroblastos e a síntese de colagénio [449, 450]. A quantidade aumentada de tecido conjuntivo encontrado nos tumores tratados poderia não estar relacionada com as células neoplásicas, mas antes com citocinas libertadas durante e após os tratamentos. Por analogia com a fisiologia dos tecidos, a degenerescência das fibras de colagénio estimula uma reacção inflamatória aguda com recrutamento de

neutrófilos, eosinófilos e posteriormente macrófagos, com vista à cicatrização, durante a qual os fibroblastos são estimulados a sintetizar colagénio [448].

Da mesma forma, no grupo de tumores não-tratados do grupo V, verificou-se um aumento muito semelhante de tecido conjuntivo no estroma tumoral. E, uma vez que a proporção de tumores com grau I e com grau II no grupo de tumores tratados e não-tratados é próxima de 1/1 e, uma vez também, que não há uma diferença estatisticamente significativa entre si, parecem estar sob a mesma influência molecular, sendo lógico pensar que essa influência se poderá dever às citocinas libertadas durante e após o tratamento hipertérmico. Pressupõe-se então que a termoterapia local desencadeia a libertação de citocinas que, directa ou indirectamente, vão reproduzir nos tumores distantes os efeitos que ocorrem localmente no tumor tratado. Esta mediação está publicada e pensa-se que os mecanismos implicados estão relacionados com citocinas com actividade de modulação do sistema imunitário conducente à lise celular pelas células NK e por linfócitos T citotóxicos [265, 267, 268, 451].

Não obstante à possibilidade do aumento do estroma estar relacionado com as citocinas, não se pode excluir a possibilidade de um acréscimo na instabilidade genómica consequente à termoterapia. Nesse caso, o calor poderia induzir a alteração da genética e epigenética fazendo emergir fenótipos favorecedores de invasão e metastização onde participam células inflamatórias associadas ao estroma e a remodelação do próprio estroma. Para investigar a origem deste aumento no tecido conjuntivo poder-se-ão efectuar perfis de expressão génica antes, imediatamente depois e uma semana após os tratamentos, podendo esses perfis vir a ser acompanhados por colheitas de sangue para medição do número de leucócitos e titulação de anticorpos. Ainda assim, e mesmo com esse planeamento, a heterogeneidade da composição histopatológica dos tumores é um factor que obriga a um grande número de animais neste tipo de estudos experimentais.

A caracterização do tratamento hipertérmico por imunohistoquímica foi muito relevante, já que nos tumores tratados a quantidade de HSP70 foi maior do que no grupo II e no que no sub-grupo de tumores não-tratados. Esta diferença está directamente relacionada com o stress térmico a que as células foram sujeitas [452-455]. Uma consequência teórica importante é a possível relação desta proteína com a indução de imunidade anti-neoplásica específica e eventual indução de apoptose [257, 262, 411, 456]. Ora, na avaliação da imunoreactividade da caspase-3 verificou-se que nos tumores tratados a imunomarcagem estava aumentada relativamente ao grupo II, o que significa que a metodologia hipertérmica usada neste trabalho foi eficaz na indução de apoptose nas células neoplásicas dos tumores tratados.

O aumento de apoptose no sub-grupo Vnt, relativamente ao grupo II, é um resultado muito promissor na terapia oncológica, pois significa que a termoterapia focal liberta moléculas de sinalização com afinidade pelas restantes células neoplásicas e que indirectamente desencadeiam apoptose. Este efeito indirecto pode estar relacionado com a activação de células dendríticas pelas proteínas de choque térmico, em especial a HSP70 que, por sua vez, activa linfócitos B e linfócitos T citotóxicos com indução selectiva de apoptose [263, 265, 268, 457, 458]. No entanto, não se verificaram alterações significativas na contagem de linfócitos T entre estes sub-grupos e o grupo II, o que pode indicar que, mais do que o número destas células, é a sua actividade que é pertinente monitorizar.

4. Caracterização da terapia complementar

4.1. Avaliação dos efeitos sistêmicos e tecidulares da terapia complementar em animais sem indução neoplásica

A avaliação do grupo que recebeu terapia complementar sem indução neoplásica indica que os parâmetros de avaliação *ante-mortem*, como a curva de crescimento e o estado geral dos animais não apresentaram diferenças relativamente ao grupo I, pelo que se conclui que este protocolo é compatível com taxas de crescimento normais e com o bem-estar dos animais. O peso médio do sub-grupo VIb relativamente a todos os outros grupos será discutido adiante após a avaliação das análises laboratoriais de maneira a integrar elementos relacionados com o metabolismo.

A análise comparativa dos parâmetros gerais de clínica laboratorial para hemograma e bioquímica sérica, entre o sub-grupo IVa e o grupo I indicou que o cálcio total do sub-grupo IVa é inferior, apesar de estar dentro do intervalo de referência, pelo que, apesar de estatisticamente significativa, não é considerada uma alteração clinicamente relevante e, atendendo a que o sub-grupo IVa foi submetido a terapia com vitamina D3, *à priori* hipercalcemiante, a ligeira diminuição encontrada não tem significado.

A bilirrubina directa, apesar de aumentada nos sub-grupos IVa mantém-se dentro dos valores normais e a bilirrubina indirecta está diminuída, mas muito próxima do limite máximo do intervalo de referência. Estes dados indicam que entre os animais, e dado o baixo número de amostras, é provável que pequenas variações individuais estejam na origem destas diferenças, que não sugerem alterações da degradação do grupo heme ou alterações do metabolismo hepático, até porque as transaminases estão dentro dos valores de referência. Estes resultados, individuais e comparativos, indicam que a vitamina D3 na dose semanal de 20µg/Kg IP durante três semanas não causa alterações relevantes nos parâmetros gerais de clínica laboratorial, por isso este protocolo é um bom ponto de partida para a sua aplicação a animais com indução neoplásica.

A análise comparativa dos parâmetros gerais do hemograma e bioquímica sérica entre o sub-grupo IVb e o grupo I indicou que, tal como no sub-grupo IVa o cálcio estava diminuído o que, como já referido, não tem relevância em animais com tratamento hipercalcemiante. Quanto aos restantes parâmetros com valores médios estatisticamente diferentes (neutrófilos, creatinina, cálcio total, bilirrubina indirecta e proteínas totais), os neutrófilos, bilirrubina indirecta e proteínas totais encontram-se com valores médios dentro do intervalo de referência e a diminuição ligeira de creatinina não tem significado em clínica laboratorial no entanto o conhecido efeito anti-inflamatório mediado pela vitamina D, e potenciado pela dexametasona [313, 319, 324, 331], pode estar relacionado com a contagem diminuída dos neutrófilos. O ligeiro aumento da bilirrubina directa também não tem significado, uma vez que a bilirrubina total se mantém dentro dos valores de referência e os eritrócitos, que são a principal fonte de grupo heme e portanto de bilirrubina directa e indirecta, estão igualmente dentro do intervalo de referência e sem diferença significativa do grupo I. A clínica laboratorial dos animais que receberam vitamina D e dexametasona é considerada normal e este protocolo, à

semelhança do protocolo com vitamina D, pode ser aplicado a animais em tratamento de diferenciação celular em contexto neoplásico.

Entre os sub-grupos que compõem o grupo IV o único parâmetro com uma diferença estatisticamente significativa é a albumina, que é inferior no sub-grupo IVb. Analisando o sub-grupo IVb, percebe-se que as proteínas totais estão diminuídas relativamente ao grupo I e que a albumina está diminuída relativamente ao sub-grupo IVa. No entanto, e apesar de não estar patente uma panhipoproteinémia, importa considerar que a dexametasona tem efeitos catabolizantes [459] e como tal pode alterar as proteínas plasmáticas, ainda assim sem um desvio acentuado.

A avaliação histológica da glândula mamária no grupo IV revelou a existência de maior quantidade de estroma no que no grupo controlo. Esta alteração pode estar relacionada com a interacção entre a vitamina D3 e a actividade celular dos fibroblastos, dotados de receptores VDR [460], podendo por isso ser estimulados por via genómica, com participação do VDRE [313, 315-319, 323, 324], no sentido de aumentarem a síntese de colagénio. Pondera-se ainda que a semi-vida de 2-3 meses do colecalciferol [322] permite que ao longo das 3 semanas de tratamento haja um efeito de estimulação continuada e cumulativa. No entanto um estudo mais alargado deverá ser feito já que a diferença com o grupo controlo não foi estatisticamente significativa.

A quantificação de mastócitos não foi alterada entre os sub-grupos do grupo IV e o grupo I, o que indica, por um lado, que a terapia complementar não interfere com o recrutamento de mastócitos para o estroma mamário e por outro, que o aumento do tecido conjuntivo é independente da estimulação pelos mastócitos. Estes resultados são originais na literatura desde logo porque a maioria dos estudos relacionados com terapias de diferenciação celular decorrem em linhas celulares e depois porque os mastócitos não têm sido alvo de grande interesse no contexto da investigação oncológica.

A avaliação efectuada por imunohistoquímica revelou que em todos os marcadores, a imunomarcação não diferiu significativamente do grupo controlo, mesmo na marcação da osteopontina o que indica que o eventual efeito indutor de diferenciação celular por mediação com vitamina D e dexametasona, não se verifica em tecidos bem diferenciados da glândula mamária.

Numa abordagem geral, os animais que receberam terapia complementar com vitamina D e dexametasona apresentaram-se sem alterações dignas de registo durante todo o período experimental. Adicionalmente, a inexistência de diferenças estatisticamente significativas entre o sub-grupo IVa e o sub-grupo IVb indica que o protocolo usado em animais sem indução neoplásica demonstra que é seguro e, assim sendo, pode ser aplicado a animais com indução neoplásica.

4.2. Avaliação dos efeitos sistémicos e tecidulares da terapia complementar em animais com indução neoplásica

No grupo VI, o rendimento de indução tumoral, volume dos tumores e o seu peso não diferem do grupo II, o que indica uma repetibilidade do modelo experimental e a validação do protocolo de indução neoplásica.

Os animais do sub-grupo VIb foram mais pesados do que todos os animais de todos os outros grupos. Um factor a ter em linha de conta passa pela integração deste resultado com a glicémia (ver adiante). Numa primeira abordagem pode-se afirmar que a conjugação de indução neoplásica com vitamina D3 e dexametasona, nas doses e intervalos referidos anteriormente, tem um efeito diferente destes fármacos quando usados individualmente. Uma vez que o factor de variação entre os sub-grupos VIa e VIb é a dexametasona, é legítimo reflectir acerca dos seus efeitos farmacológicos no metabolismo de animais com neoplasias mamárias que receberam vitamina D3. A dexametasona, enquanto um agente farmacológico catabólico e hiperglicemiante [459] permite aos tumores a aquisição de toda a glicose de que necessitam, levando a um estado hiperglicémico permanente. Por outro lado, tem também uma acção sinérgica com a vitamina D no sentido de induzir a diferenciação celular que, como se irá discutir adiante, se verifica neste grupo, de modo que a glicose, ao não ser consumida pelas células neoplásicas bem diferenciadas e, por isso sem reprogramação metabólica, estimula a síntese de insulina que se liga ao seu receptor na membrana do hepatócito e permite a entrada de glicose e a activação da via da glucogénese [461]. Também nos adipócitos o receptor da insulina permite a entrada da glicose e a síntese de triglicéridos [461]. O efeito global destes mecanismos propostos é o aumento do peso em animais onde a diferenciação celular de neoplasias foi bem-sucedida pelo tratamento com terapia complementar de vitamina D3 e dexametasona.

O resultado dos valores médios relativos aos parâmetros avaliados pela clínica laboratorial para o subgrupo VIa indicaram desvios muito reduzidos do hemograma para a CHCM e plaquetas que não têm significado dentro na normalidade dos restantes parâmetros. Na bioquímica sérica o aumento da ureia é muito ligeiro e não está acompanhado por um aumento da creatinina, pelo que se entende estar afecto a variações pré-renais de urémia sem impacto sistémico. No sub-grupo VIb bilirrubina total está ligeiramente diminuída e sem significado clínico. O aumento da glicémia está presente nos sub-grupos VIa e VIb, com significância estatística relativamente ao grupo I, o que pode estar relacionado com as alterações metabólicas induzidas pelos carcinomas - efeito Warburg -, já que passam por uma adaptação do metabolismo energético no sentido de privilegiarem o consumo de glicose [462, 463], obrigando todo o metabolismo do animal a um mecanismo compensatório que aumenta a glicémia para níveis superiores ao normal. Nos sub-grupos que compõem o grupo VI, a bilirrubina total e a bilirrubina indirecta estão diminuídas, relativamente ao grupo de controlo, mas dentro do intervalo de referência, o que se entende serem pequenos desvios causados por um número de animais relativamente pequeno, já que os parâmetros eritrocitários e hepáticos estão normais. O mesmo se aplica ao colesterol e à creatinina.

No sub-grupo VIa o número de leucócitos foi mais elevado do que no sub-grupo IVa o que é compreendido no âmbito da interacção entre as neoplasias e um estado induzido de inflamação permanente o que eleva, naturalmente, os valores médios de leucócitos, nomeadamente de neutrófilos [133, 134]. Curiosamente no sub-grupo VIb apenas os neutrófilos estão mais elevados relativamente ao sub-grupo IVb, o que, em tumores com indução de diferenciação celular, pode ser entendido enquanto uma perda da capacidade em induzir uma reacção inflamatória por parte das células neoplásicas destes tumores tratados. Outra reflexão se impõe para esta neutrofilia, é que em geral os tumores induzem uma inflamação aguda onde os neutrófilos são numerosos, mas por outro lado a dexametasona inibe a marginação e, por conseguinte, a diapedese destas células para os tecidos, ficando uma população aumentada de neutrófilos em circulação [464]. A diminuição dos parâmetros creatinina, bilirrubina total, directa e indirecta e albumina do subgrupo VIb relativamente ao sub-grupo IVb, estão dentro dos respectivos intervalos de referência, pelo que não indicam alterações metabólicas causadas pelos tumores nem pela terapia complementar.

A avaliação microscópica do grupo VI revelou semelhanças histopatológicas com o grupo II relativamente à estrutura do parênquima, tendo-se verificado, no entanto, um marcado aumento do estroma que não é acompanhado por um aumento da contagem dos mastócitos, pelo que o tecido conjuntivo se considera, não uma desmoplasia, mas antes uma fibroplasia. Integrando ainda os resultados da imunomarcagem para a osteopontina, que se relaciona com um aumento da diferenciação celular e formação de proteínas morfogénicas do osso, como o colagénio tipo I, entre outras [144, 323, 330, 335, 337, 339], é sensato relacionar a fibrose com a diferenciação celular no sentido da linha osteoblástica.

Os dois tumores em remissão do grupo VIb são provenientes de animais diferentes e isso implica que este resultado não se deve a uma variabilidade genética de um indivíduo da estirpe Sprague-Dawley, mas sim ao protocolo experimental. Nesses tumores a presença de ferro intracelular lembra as células luminais da glândula mamária normal, no entanto análises moleculares mais específicas são necessárias para verificar esta transformação.

A avaliação por imunohistoquímica do tecido glandular mamário revelou que a terapia complementar não altera a imunomarcagem, pelos anticorpos usados neste estudo. Em contexto neoplásico as diferenças encontradas entre os sub-grupos VIa e VIb, no que respeita à imunomarcagem do receptor de estrogénio, mais acentuada no último sub-grupo, é um elemento que aproxima as células neoplásicas das células bem diferenciadas. A proliferação aumentada no grupo VIa relativamente ao grupo II, avaliada pelo anticorpo Ki67, parece contrariar o efeito antiproliferativo da vitamina D descrito na literatura [317, 318, 323]. No entanto, este resultado não parece muito relevante já que a distribuição percentual dos tumores em função do grau tumoral não é paralela entre estes dois grupos, de modo que seria necessário seleccionar do grupo II tumores com características semelhantes aos tumores do sub-grupo VIa. Também os resultados para a imunomarcagem da caspase 3 são muito promissores quanto aos efeitos anti-neoplásicos da terapia complementar, uma vez que em todos os animais do grupo VI a apoptose foi mais prevalente indicando a integridade da regulação do

ciclo celular onde a vitamina D actua parcialmente por intermédio do VDRE [316, 319, 330]. Este efeito é ainda mais acentuado com a adição da dexametasona o que está já documentado [324].

A inexistência de diferenças estatisticamente significativas, quanto à imunomarcação de linfócitos T pelo marcador de CD3, entre o grupo VI e o grupo I e entre os sub-grupos VIa e VIb, indica que a antigenicidade dos tumores não é afectada pela terapia complementar.

Os resultados da imunohistoquímica para a imunomarcação da osteopontina são dos mais marcantes neste trabalho. Esta proteína morfogénica de osso é sintetizada e libertada para o estroma por células tipo-osteoblasto [323, 335, 337]. Há também células neoplásicas, de neoplasias mamárias, que sintetizam esta proteína, mas nesse caso não ficam residentes no estroma [232, 345], de modo que a imunomarcação forte do estroma tumoral nos tumores do sub-grupo VIb, em especial dos tumores em remissão deve-se ao redireccionamento de células epiteliais cancerígenas no sentido da diferenciação osteoblástica e é o achado mais relevante do protocolo de terapia complementar. Não obstante ao optimismo gerado pelos resultados da diferenciação celular, importa referir que a osteopontina é uma proteína morfogénica do osso sintetizada nas fases mais precoces da diferenciação celular no sentido osteoblástico, por isso seria pertinente adicionar outros imunomarcadores mais tardios da diferenciação como a osteocalcina.

Uma desvantagem deste desenho experimental prende-se com a ausência de avaliação dos tumores antes e durante os tratamentos, ou seja *ante-mortem*. A heterogeneidade neoplásica não permite relacionar com rigor a relação causa-efeito com um determinado tipo celular, dentro da linha de diferenciação, nem com um determinado tipo histológico estrutural. Esta lacuna apenas poderia ser ultrapassada com biópsias antes dos procedimentos, mas, por sua vez, também implicam cuidados pré-cirúrgicos e anestésicos, para além de induzirem inevitavelmente alterações inflamatórias locais com potencial repercussão nos resultados terapêuticos e nos fármacos a aplicar. Estes aspectos podem ser minimizados através de amostragem citológica por agulha fina que, sendo minimamente invasiva, permite recolher células neoplásicas para caracterização por técnicas de biologia molecular, com a vantagem deste procedimento poder ser realizado a vários tempos e assim monitorizar a evolução das células e da sua expressão génica [37, 168-171].

Capítulo VI

Conclusão

Capítulo VI

Conclusão e trabalho para o futuro

A originalidade deste trabalho de investigação encontra-se em vários níveis ao longo da dissertação. Desde logo na abordagem ao modelo experimental por meio de análise multivariada, depois na caracterização conjugada de histopatologia por HE e por colorações especiais de histoquímica, que são muito rápidas e económicas, que fornecem informação clara e relevante e ainda pela abordagem quantitativa directa de um conjunto original de anticorpos imunomarcadores. Este trabalho teve ainda uma forte componente de estatística sem a qual não teria sido possível conjugar os resultados de todas as avaliações.

A caracterização do modelo experimental pela análise de componentes principais identificou, nos diferentes graus tumorais, a contribuição dos padrões estruturais para o posicionamento de cada tumor dentro da heterogeneidade das neoplasias que compõem cada grau. A prevalência do padrão cribriforme é importante para distinguir a malignidade de tumores e é um potencial factor de discriminação. A necrose e a hemorragia são parâmetros pertinentes para distinguir o grau de malignidade entre tumores do mesmo grau, em especial se forem de padrão papilar ou tubular ou uma conjugação de ambos. Pode-se assim concluir que a análise efectuada melhora o sistema actual de graduação NGS.

Da integração dos dados mais relevantes desta dissertação ficam a comprovada eficácia antineoplásica da termoterapia focal nos tumores tratados e a indução de apoptose em células neoplásicas nos restantes tumores mamários desses animais por provável modulação da sinalização celular e imunitária. As nanopartículas ferrimagnéticas são biocompatíveis e induzem a formação local de uma cápsula conjuntiva sem causar um impacto sistémico relevante. A termoterapia focal permite induzir a apoptose em células aquecidas e que, aparentemente desencadeiam efeitos imunológicos e celulares que se repercutem em células neoplásicas distantes. Estes dados podem ter relevância em oncologia humana e veterinária em doentes imunocompetente com tumores metastisados. Mais ainda, sendo uma terapêutica económica que pode desencadear uma resposta imunitária anti-tumoral específica, tem uma grande proximidade com as linhas de orientação das terapêuticas personalizadas da actualidade.

A termoterapia focal é, no entanto, uma técnica muito exigente do ponto de vista logístico e de monitorização instantânea da temperatura do tumor tratado e do estado geral dos animais em anestesia e durante o recobro. Dada a heterogeneidade histopatológica e angiogénica dos tumores, não é possível garantir que a temperatura do intervalo hipertérmico 38-43°C não tenha sido ultrapassada instantaneamente, podendo ser essa a causa de alguma variabilidade nos resultados. Estas vicissitudes podem, no futuro ser contornadas através de um desenho experimental baseado em oncoterapia.

A terapia complementar com vitamina D e dexametasona induziu diferenciação osteoblástica, a partir de células neoplásicas de carcinoma mamário, com síntese de osteopontina para o estroma e regressão morfológica da anaplasia do parênquima tumoral. A avaliação da diferenciação celular pode ainda ser complementada por imunohistoquímica com anticorpo anti-osteocalcina e por análise de expressão génica. O optimismo gerado por estes resultados carece, no entanto, de um desenho experimental que se justifica a partir de agora, de modo a aumentar o número de animais sujeitos a factores mais detalhados relativamente à dosagem, tempos de administração e parâmetros de avaliação, nos quais deviam ser incluídas as análises genéticas e de expressão génica *ante-mortem*, por citologia, e *post-mortem*.

Capítulo VII

Bibliografía

Capítulo VII

Bibliografía

1. Rudmann D, Cardiff R, Chouinard L, Goodman D, Kuttler K, Marxfeld H, Molinolo A, Treumann S, Yoshizawa K: **Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse mammary, Zymbal's, preputial, and clitoral glands.** *Toxicol Pathol* 2012, **40**(6 Suppl):7S-39S.
2. Gardner MB: **One medicine: an introduction.** *Breast disease* 2007, **28**:1-5.
3. McDole KM, Lelievre SA: **Uncertainty in mammary cancer outcomes: comparative oncology to the rescue!** *Vet J* 2012, **194**(1):3-4.
4. Munson L, Moresco A: **Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals.** *Breast disease* 2007, **28**:7-21.
5. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gartner F: **Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis.** *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2012, **159**(3):165-172.
6. Matos AJ, Baptista CS, Gartner MF, Rutteman GR: **Prognostic studies of canine and feline mammary tumours: the need for standardized procedures.** *Vet J* 2012, **193**(1):24-31.
7. Rowell JL, McCarthy DO, Alvarez CE: **Dog models of naturally occurring cancer.** *Trends in molecular medicine* 2011, **17**(7):380-388.
8. Withrow SJ: **Why worry about cancer in pets?** In: *Small Animal Clinical Oncology*. Fourth ed edn. Edited by Elsevier S: St. Louis, MO, USA; 2007: p. p. xv, xvi.
9. Morrison WB: **Cancer chemotherapy: an annotated history.** *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 2010, **24**(6):1249-1262.
10. Hajdu SI: **A note from history: landmarks in history of cancer, part 1.** *Cancer* 2011, **117**(5):1097-1102.
11. Sudhakar A: **History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods.** *Journal of cancer science & therapy* 2009, **1**(2):1-4.
12. Hajdu SI: **A note from history: landmarks in history of cancer, part 2.** *Cancer* 2011, **117**(12):2811-2820.
13. DeVita VT, Jr., Rosenberg SA: **Two hundred years of cancer research.** *The New England journal of medicine* 2012, **366**(23):2207-2214.
14. Peter Boyle, Levin B: **World cancer report, 2008.** Lyon, France: IARC Press; 2008.
15. Desantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A: **Breast cancer statistics, 2013.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2013.
16. Wyld L: **Optimal Approach in Early Breast Cancer.** *EJC Supplements* 2013, **11**:1-2.
17. Rajan A, Caldas C, van Luenen H, Saghatchian M, van Harten WH: **Assessing excellence in translational cancer research: a consensus based framework.** *Journal of translational medicine* 2013, **11**(1):274.
18. Yarden Y, Caldas C: **Basic cancer research is essential for the success of personalised medicine.** *Eur J Cancer* 2013, **49**(12):2619-2620.
19. Abdulrahman GO, Jr., Rahman GA: **Epidemiology of breast cancer in europe and Africa.** *Journal of cancer epidemiology* 2012, **2012**:915610.

20. Youlten DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD: **The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality.** *Cancer epidemiology* 2012, **36**(3):237-248.
21. Weiderpass E, Meo M, Vainio H: **Risk factors for breast cancer, including occupational exposures.** *Safety and health at work* 2011, **2**(1):1-8.
22. Bikle DD: **Vitamin D and cancer: the promise not yet fulfilled.** *Endocrine* 2014, **46**(1):29-38.
23. Benz CC: **Impact of aging on the biology of breast cancer.** *Critical reviews in oncology/hematology* 2008, **66**(1):65-74.
24. Thomas GA, Leonard RC: **How age affects the biology of breast cancer.** *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2009, **21**(2):81-85.
25. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.** *Eur J Cancer* 2013, **49**(6):1374-1403.
26. Schwartz GF, Hughes KS, Lynch HT, Fabian CJ, Fentiman IS, Robson ME, Domchek SM, Hartmann LC, Holland R, Winchester DJ *et al*: **Proceedings of the international consensus conference on breast cancer risk, genetics, & risk management, April, 2007.** *The breast journal* 2009, **15**(1):4-16.
27. Carey LA: **Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000-2010.** *Clinical breast cancer* 2010, **10**(3):188-195.
28. Klassen AC, Smith KC: **The enduring and evolving relationship between social class and breast cancer burden: A review of the literature.** *Cancer epidemiology* 2011, **35**(3):217-234.
29. Baba AI, Căttoi C: **Mammary gland tumors.** In: *Comparative Oncology.* edn. Edited by Baba AI, Căttoi C: The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
30. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V *et al*: **Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors.** *BMC genomics* 2009, **10**:135.
31. Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S: **Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours.** *Research in Veterinary Science* 2006, **81**(2):218-224.
32. Misdorp W: **Veterinary cancer epidemiology.** *The Veterinary quarterly* 1996, **18**(1):32-36.
33. Bronden LB, Flagstad A, Kristensen AT: **Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review.** *Veterinary and comparative oncology* 2007, **5**(3):133-144.
34. Porrello A, Cardelli P, Spugnini EP: **Oncology of companion animals as a model for humans. an overview of tumor histotypes.** *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 2006, **25**(1):97-105.
35. Kumaraguruparan R, Karunakaran D, Balachandran C, Manohar BM, Nagini S: **Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2006, **365**(1-2):168-176.
36. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH: **Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms.** *Veterinary pathology* 2011, **48**(1):85-97.
37. Shafiee R, Javanbakht J, Atyabi N, Kheradmand P, Kheradmand D, Bahrami A, Daraei H, Khadivar F: **Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: an Clinico-Cytohistopathological study with environmental factors influencing public health and medicine.** *Cancer cell international* 2013, **13**(1):79.
38. Strandberg JD, Goodman DG: **Animal model of human disease: canine mammary neoplasia.** *The American journal of pathology* 1974, **75**(1):225-228.

39. Lipscomb TP: **Prognostic-studies-of-mammary-and-other-neoplasia-in-veterinary-medicine-A-new-paradigm**. *The Veterinary Journal* 2012.
40. Martineau D, Lemberger K, Dallaire A, Labelle P, Lipscomb TP, Michel P, Mikaelian I: **Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada**. *Environmental health perspectives* 2002, **110**(3):285-292.
41. Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E: **Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time?** *Trends in molecular medicine* 2012, **18**(9):509-515.
42. Plankar M, Jerman I, Krasovec R: **On the origin of cancer: can we ignore coherence?** *Progress in biophysics and molecular biology* 2011, **106**(2):380-390.
43. Baird RD, Caldas C: **Genetic heterogeneity in breast cancer: the road to personalized medicine?** *BMC medicine* 2013, **11**:151.
44. Harrington KJ: **Biology of cancer**. *Medicine* 2011, **39**(12):689-692.
45. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA: **The cancer genome**. *Nature* 2009, **458**(7239):719-724.
46. Ciccia A, Elledge SJ: **The DNA damage response: making it safe to play with knives**. *Molecular cell* 2010, **40**(2):179-204.
47. Stricker T: **Neoplasia**. In: *Robbins Basic Pathology*. 9th edn. Edited by Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Elsevier Saunders; 2013: 161-214.
48. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control**. *Nature medicine* 2004, **10**(8):789-799.
49. Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Moriwaki H: **Chemical-induced Carcinogenesis**. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* 2013, **5**(6):203-209.
50. Mardis ER: **Genome sequencing and cancer**. *Current opinion in genetics & development* 2012, **22**(3):245-250.
51. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, Lin ML, Ordonez GR, Bignell GR *et al*: **A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome**. *Nature* 2010, **463**(7278):191-196.
52. Chen Y, Hao J, Jiang W, He T, Zhang X, Jiang T, Jiang R: **Identifying potential cancer driver genes by genomic data integration**. *Scientific reports* 2013, **3**:3538.
53. Bignell GR, Greenman CD, Davies H, Butler AP, Edkins S, Andrews JM, Buck G, Chen L, Beare D, Latimer C *et al*: **Signatures of mutation and selection in the cancer genome**. *Nature* 2010, **463**(7283):893-898.
54. Polyak K: **Breast cancer: origins and evolution**. *The Journal of clinical investigation* 2007, **117**(11):3155-3163.
55. Santagata S, Thakkar A, Ergonul A, Wang B, Woo T, Hu R, Harrell JC, McNamara G, Schwede M, Culhane AC *et al*: **Taxonomy of breast cancer based on normal cell phenotype predicts outcome**. *The Journal of clinical investigation* 2014, **124**(2):859-870.
56. Polyak K: **Heterogeneity in breast cancer**. *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(10):3786-3788.
57. Visvader JE: **Cells of origin in cancer**. *Nature* 2011, **469**(7330):314-322.
58. Pang LY, Argyle D: **Cancer stem cells and telomerase as potential biomarkers in veterinary oncology**. *Vet J* 2010, **185**(1):15-22.
59. Valarmathi MT, Biechler SV: **Feline mammary neoplasms: the cancer stem cell hypothesis**. *Vet J* 2013, **196**(3):277-278.
60. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell* 2011, **144**(5):646-674.
61. Fulda S: **Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells**. *Cancer letters* 2013, **338**(1):168-173.

62. Bjerkvig R, Johansson M, Miletic H, Niclou SP: **Cancer stem cells and angiogenesis**. *Seminars in cancer biology* 2009, **19**(5):279-284.
63. Jefford CE, Irminger-Finger I: **Mechanisms of chromosome instability in cancers**. *Critical reviews in oncology/hematology* 2006, **59**(1):1-14.
64. Polyak K, Marusyk A: **Cancer: Clonal cooperation**. *Nature* 2014, **508**(7494):52-53.
65. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J: **Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype**. *Journal of clinical pathology* 2011, **64**(11):937-946.
66. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A: **Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways**. *Cancer treatment reviews* 2012, **38**(6):698-707.
67. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG: **Cancer stem cells**. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2012, **44**(12):2144-2151.
68. Badve S, Nakshatri H: **Breast-cancer stem cells-beyond semantics**. *Lancet Oncol* 2012, **13**(1):e43-48.
69. Zapperi S, La Porta CA: **Do cancer cells undergo phenotypic switching? The case for imperfect cancer stem cell markers**. *Scientific reports* 2012, **2**:441.
70. Withrow SJ: **The biology and pathogenesis of cancer**. In: *Small Animal Clinical Oncology*. Fourth edn. Edited by Elsevier S. St. Louis, MO, USA; 2007: 3-94.
71. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C *et al*: **Patterns of somatic mutation in human cancer genomes**. *Nature* 2007, **446**(7132):153-158.
72. Mattison J, van der Weyden L, Hubbard T, Adams DJ: **Cancer gene discovery in mouse and man**. *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1796**(2):140-161.
73. Mardis ER, Wilson RK: **Cancer genome sequencing: a review**. *Human molecular genetics* 2009, **18**(R2):R163-168.
74. Webster JD, Dennis MM, Dervisis N, Heller J, Bacon NJ, Bergman PJ, Bienzle D, Cassali G, Castagnaro M, Cullen J *et al*: **Recommended guidelines for the conduct and evaluation of prognostic studies in veterinary oncology**. *Veterinary pathology* 2011, **48**(1):7-18.
75. Suva ML, Riggi N, Bernstein BE: **Epigenetic reprogramming in cancer**. *Science* 2013, **339**(6127):1567-1570.
76. Biran A, Meshorer E: **Concise review: chromatin and genome organization in reprogramming**. *Stem Cells* 2012, **30**(9):1793-1799.
77. Hassler MR, Egger G: **Epigenomics of cancer - emerging new concepts**. *Biochimie* 2012, **94**(11):2219-2230.
78. Jones PA, Baylin SB: **The epigenomics of cancer**. *Cell* 2007, **128**(4):683-692.
79. Herceg Z, Vaissiere T: **Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome**. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2011, **6**(7):804-819.
80. Deaton AM, Bird A: **CpG islands and the regulation of transcription**. *Genes & development* 2011, **25**(10):1010-1022.
81. Fucito A, Lucchetti C, Giordano A, Romano G: **Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: what are the perspectives for clinical practice?** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008, **40**(4):565-575.
82. Baylin SB, Jones PA: **A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications**. *Nature reviews Cancer* 2011, **11**(10):726-734.
83. O'Hagan HM, Wang W, Sen S, Destefano Shields C, Lee SS, Zhang YW, Clements EG, Cai Y, Van Neste L, Easwaran H *et al*: **Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands**. *Cancer cell* 2011, **20**(5):606-619.

84. Teodoridis JM, Hardie C, Brown R: **CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications.** *Cancer letters* 2008, **268**(2):177-186.
85. Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y: **MiR-200, a new star miRNA in human cancer.** *Cancer letters* 2013.
86. Le Quesne J, Caldas C: **Micro-RNAs and breast cancer.** *Molecular oncology* 2010, **4**(3):230-241.
87. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T: **MicroRNAs in human cancer.** *Advances in experimental medicine and biology* 2013, **774**:1-20.
88. Wouters MD, van Gent DC, Hoeijmakers JH, Pothof J: **MicroRNAs, the DNA damage response and cancer.** *Mutation research* 2011, **717**(1-2):54-66.
89. Wan G, Mathur R, Hu X, Zhang X, Lu X: **miRNA response to DNA damage.** *Trends in biochemical sciences* 2011, **36**(9):478-484.
90. Voorhoeve PM: **MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity?** *Biochimica et biophysica acta* 2010, **1805**(1):72-86.
91. Liu H: **MicroRNAs in breast cancer initiation and progression.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2012, **69**(21):3587-3599.
92. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P: **Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression.** *Biochimica et biophysica acta* 2013, **1833**(12):3481-3498.
93. Lopez-Otin C, Hunter T: **The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(4):278-292.
94. Witsch E, Sela M, Yarden Y: **Roles for growth factors in cancer progression.** *Physiology (Bethesda)* 2010, **25**(2):85-101.
95. Lemmon MA, Schlessinger J: **Cell signaling by receptor tyrosine kinases.** *Cell* 2010, **141**(7):1117-1134.
96. Orr B, Compton DA: **A double-edged sword: how oncogenes and tumor suppressor genes can contribute to chromosomal instability.** *Frontiers in oncology* 2013, **3**:164.
97. Tysnes BB, Bjerkvig R: **Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment.** *Biochimica et biophysica acta* 2007, **1775**(2):283-297.
98. Signore M, Ricci-Vitiani L, De Maria R: **Targeting apoptosis pathways in cancer stem cells.** *Cancer letters* 2013, **332**(2):374-382.
99. Abbas T, Keaton MA, Dutta A: **Genomic instability in cancer.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(3):a012914.
100. Chu LL, Rutteman GR, Kong JM, Ghahremani M, Schmeing M, Misdorp W, van Garderen E, Pelletier J: **Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia.** *Breast cancer research and treatment* 1998, **50**(1):11-25.
101. Larsson LG: **Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence.** *Seminars in cancer biology* 2011, **21**(6):367-376.
102. Correia-Melo C, Hewitt G, Passos JF: **Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence?** *Longevity & healthspan* 2014, **3**(1):1.
103. Artandi SE, DePinho RA: **Telomeres and telomerase in cancer.** *Carcinogenesis* 2010, **31**(1):9-18.
104. Kroll KM, Ferrantini A, Domany E: **Introduction to biology and chromosomal instabilities in cancer.** *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 2010, **389**(20):4374-4388.
105. Sahin E, DePinho RA: **Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2012, **13**(6):397-404.
106. Aivaliotis IL, Pateras IS, Papaioannou M, Glytsou C, Kontzoglou K, Johnson EO, Zoumpourlis V: **How do cytokines trigger genomic instability?** *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, **2012**:536761.
107. White E: **Entosis: it's a cell-eat-cell world.** *Cell* 2007, **131**(5):840-842.

108. Buchheit CL, Rayavarapu RR, Schafer ZT: **The regulation of cancer cell death and metabolism by extracellular matrix attachment.** *Seminars in cell & developmental biology* 2012, **23**(4):402-411.
109. Elmore S: **Apoptosis: a review of programmed cell death.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**(4):495-516.
110. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ *et al*: **Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes.** *Journal of medical genetics* 2009, **46**(8):497-510.
111. Weerasinghe P, Buja LM: **Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death.** *Experimental and molecular pathology* 2012, **93**(3):302-308.
112. Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA: **Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer.** *Journal of cell science* 2011, **124**(Pt 19):3189-3197.
113. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E: **Role of autophagy in cancer.** *Nature reviews Cancer* 2007, **7**(12):961-967.
114. Lozy F, Karantza V: **Autophagy and cancer cell metabolism.** *Seminars in cell & developmental biology* 2012, **23**(4):395-401.
115. Rubinstein AD, Kimchi A: **Life in the balance - a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis.** *Journal of cell science* 2012, **125**(Pt 22):5259-5268.
116. Mizushima N, Komatsu M: **Autophagy: renovation of cells and tissues.** *Cell* 2011, **147**(4):728-741.
117. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT: **PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity.** *Immunological reviews* 2012, **249**(1):158-175.
118. White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y, Mathew R: **Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer.** *Current opinion in cell biology* 2010, **22**(2):212-217.
119. Wei H, Guan JL: **Pro-tumorigenic function of autophagy in mammary oncogenesis.** *Autophagy* 2012, **8**(1):129-131.
120. Chen N, Karantza-Wadsworth V: **Role and regulation of autophagy in cancer.** *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1793**(9):1516-1523.
121. Meschini S, Condello M, Lista P, Arancia G: **Autophagy: Molecular mechanisms and their implications for anticancer therapies.** *Current cancer drug targets* 2011, **11**(3):357-379.
122. Frisch SM, Schaller M, Cieply B: **Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis.** *Journal of cell science* 2013, **126**(Pt 1):21-29.
123. Bellocin DI, Das B, Felsher DW: **Tumor dormancy, oncogene addiction, cellular senescence, and self-renewal programs.** *Advances in experimental medicine and biology* 2013, **734**:91-107.
124. Quail DF, Joyce JA: **Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.** *Nature medicine* 2013, **19**(11):1423-1437.
125. Hanahan D, Coussens LM: **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** *Cancer cell* 2012, **21**(3):309-322.
126. Polyak K, Kalluri R: **The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010, **2**(11):a003244.
127. Kundu JK, Surh YJ: **Emerging avenues linking inflammation and cancer.** *Free radical biology & medicine* 2012, **52**(9):2013-2037.
128. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M: **Immunity, inflammation, and cancer.** *Cell* 2010, **140**(6):883-899.
129. DeNardo DG, Coussens LM: **Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression.** *Breast cancer research : BCR* 2007, **9**(4):212.
130. Murphy MA, O'Leary JJ, Cahill DJ: **Assessment of the humoral immune response to cancer.** *Journal of proteomics* 2012, **75**(15):4573-4579.

131. Fukuda K, Kobayashi A, Watabe K: **The role of tumor-associated macrophage in tumor progression.** *Front Biosci (Schol Ed)* 2012, **4**:787-798.
132. Trinchieri G: **Inflammation.** In: *Cancer: Principles and practice of oncology.* 9th edn. Edited by DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 193-202.
133. Castaño Z, Fillmore CM, Kim CF, McAllister SS: **The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells.** *Seminars in cancer biology* 2012, **22**(5-6):462-470.
134. Sansone P, Bromberg J: **Environment, inflammation, and cancer.** *Current opinion in genetics & development* 2011, **21**(1):80-85.
135. Ribatti D, Crivellato E: **Mast cells, angiogenesis, and tumour growth.** *Biochimica et biophysica acta* 2012, **1822**(1):2-8.
136. Della Rovere F, Granata A, Monaco M, Basile G: **Phagocytosis of cancer cells by mast cells in breast cancer.** *Anticancer research* 2009, **29**(8):3157-3161.
137. Merluzzi S, Betto E, Ceccaroni AA, Magris R, Giunta M, Mion F: **Mast cells, basophils and B cell connection network.** *Molecular immunology* 2014.
138. Russo IH, Russo J: **Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies.** *Environmental health perspectives* 1996, **104**(9):938-967.
139. Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tete S, Mastrangelo F, Perrella A, De Lutiis MA, Tagen M *et al*: **Role of mast cells in tumor growth.** *Annals of clinical and laboratory science* 2007, **37**(4):315-322.
140. Theoharides TC, Conti P: **Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth.** *Trends in immunology* 2004, **25**(5):235-241.
141. Mellman I, Yarden Y: **Endocytosis and cancer.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(12).
142. Lewis CE, Hughes R: **Inflammation and breast cancer. Microenvironmental factors regulating macrophage function in breast tumours: hypoxia and angiopoietin-2.** *Breast cancer research : BCR* 2007, **9**(3):209.
143. Psaila B, Lyden D: **The metastatic niche: adapting the foreign soil.** *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(4):285-293.
144. McCormack N, O'Dea S: **Regulation of epithelial to mesenchymal transition by bone morphogenetic proteins.** *Cellular signalling* 2013, **25**(12):2856-2862.
145. Kalluri R, Weinberg RA: **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(6):1420-1428.
146. Leibovich-Rivkin T, Liubomirski Y, Bernstein B, Meshel T, Ben-Baruch A: **Inflammatory Factors of the Tumor Microenvironment Induce Plasticity in Nontransformed Breast Epithelial Cells: EMT, Invasion, and Collapse of Normally Organized Breast Textures.** *Neoplasia* 2013, **15**(12):1330-1346.
147. Descot A, Oskarsson T: **The molecular composition of the metastatic niche.** *Experimental cell research* 2013.
148. Zhang HG, Grizzle WE: **Exosomes: A Novel Pathway of Local and Distant Intercellular Communication that Facilitates the Growth and Metastasis of Neoplastic Lesions.** *The American journal of pathology* 2014, **184**(1):28-41.
149. Whiteside TL: **Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes).** *Biochemical Society transactions* 2013, **41**(1):245-251.
150. De Wever O, Van Bockstal M, Mareel M, Hendrix A, Bracke M: **Carcinoma-associated fibroblasts provide operational flexibility in metastasis.** *Seminars in cancer biology* 2014.
151. Siemann DW: **The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents.** *Cancer treatment reviews* 2011, **37**(1):63-74.

152. Bagri A, Kouros-Mehr H, Leong KG, Plowman GD: **Use of anti-VEGF adjuvant therapy in cancer: challenges and rationale.** *Trends in molecular medicine* 2010, **16**(3):122-132.
153. Hall AP: **Review of the pericyte during angiogenesis and its role in cancer and diabetic retinopathy.** *Toxicol Pathol* 2006, **34**(6):763-775.
154. Ribatti D: **Cancer stem cells and tumor angiogenesis.** *Cancer letters* 2012, **321**(1):13-17.
155. Habash RW, Krewski D, Bansal R, Alhafid HT: **Principles, applications, risks and benefits of therapeutic hyperthermia.** *Front Biosci (Elite Ed)* 2011, **3**:1169-1181.
156. Yuspa SH, Shields PG: **Chemical Factors.** In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 9th edn. Edited by DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 203-208.
157. Hecht SS: **Tobacco.** In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 9th edn. Edited by DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 150-160.
158. Hang B: **Formation and repair of tobacco carcinogen-derived bulky DNA adducts.** *Journal of nucleic acids* 2010, **2010**:709521.
159. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA: **Environmental and chemical carcinogenesis.** *Seminars in cancer biology* 2004, **14**(6):473-486.
160. IARC: **Production, Composition, Use and Regulations.** In: *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Tobacco smoke and involuntary smoking. Volume 83, 2004/08/03* edn. Edited by Group IW: IARC Press; 2004: 53-119.
161. IARC: **Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines.** *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 2007, **89**:1-592.
162. Schiller JT, Lowy DR: **Virus infection and human cancer: an overview.** *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2014, **193**:1-10.
163. Moore PS, Chang Y: **Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology.** *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(12):878-889.
164. Ljungman M: **Physical factors.** In: *Cancer: Principles and practice of oncology.* edn. Edited by DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 209-216.
165. Azzam El, Jay-Gerin J-P, Pain D: **Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury.** *Cancer letters* 2012, **327**(1-2):48-60.
166. Suzuki K, Yamashita S: **Low-dose radiation exposure and carcinogenesis.** *Japanese journal of clinical oncology* 2012, **42**(7):563-568.
167. Michels KB, Willett WC: **Dietary factors.** In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 9th edn. Edited by DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 217-226.
168. Garbar C, Cure H: **Fine-needle aspiration cytology can play a role in neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer.** *ISRN oncology* 2013, **2013**:935796.
169. Kocjan G, Bourgain C, Fassina A, Hagmar B, Herbert A, Kapila K, Kardum-Skelin I, Kloboves-Prevodnik V, Krishnamurthy S, Koutselini H *et al*: **The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice.** *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology* 2008, **19**(5):271-278.
170. Takhellambam YS, Lourembam SS, Sapam OS, Kshetrimayum RS, Ningthoujam BS, Khan T: **Comparison of ultrasonography and fine needle aspiration cytology in the diagnosis of malignant breast lesions.** *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2013, **7**(12):2847-2850.
171. Tos APD: **The role of the pathologist in the decision-making process.** *E J C Supplements* 2013, **11**:23-26.
172. Belkic D, Belkic K: **Molecular imaging in the framework of personalized cancer medicine.** *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 2013, **15**(11):665-672.

173. Propper AY, Howard BA, Veltmaat JM: **Prenatal morphogenesis of mammary glands in mouse and rabbit.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2013, **18**(2):93-104.
174. Rowson AR, Daniels KM, Ellis SE, Hovey RC: **Growth and development of the mammary glands of livestock: a veritable barnyard of opportunities.** *Seminars in cell & developmental biology* 2012, **23**(5):557-566.
175. Veltmaat JM, Ramsdell AF, Sterneck E: **Positional variations in mammary gland development and cancer.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2013, **18**(2):179-188.
176. Rivera P, von Euler H: **Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors.** *Veterinary pathology* 2011, **48**(1):132-146.
177. Tarara RP: **Review of mammary gland neoplasia in nonhuman primates.** *Breast disease* 2007, **28**:23-27.
178. Molyneux G, Smalley MJ: **The cell of origin of BRCA1 mutation-associated breast cancer: a cautionary tale of gene expression profiling.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2011, **16**(1):51-55.
179. Gusterson BA, Stein T: **Human breast development.** *Seminars in cell & developmental biology* 2012, **23**(5):567-573.
180. Shehata M, Teschendorff A, Sharp G, Novcic N, Russell A, Avril S, Prater M, Eirew P, Caldas C, Watson CJ *et al*: **Phenotypic and functional characterization of the luminal cell hierarchy of the mammary gland.** *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(5):R134.
181. Asselin-Labat ML, Vaillant F, Shackleton M, Bouras T, Lindeman GJ, Visvader JE: **Delineating the epithelial hierarchy in the mouse mammary gland.** *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2008, **73**:469-478.
182. Fridriksdottir AJ, Petersen OW, Ronnov-Jessen L: **Mammary gland stem cells: current status and future challenges.** *The International journal of developmental biology* 2011, **55**(7-9):719-729.
183. Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, Isacke CM, Ashworth A, Smalley MJ: **Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland.** *The Journal of cell biology* 2007, **176**(1):19-26.
184. Cardiff RD, Borowsky AD: **At last: classification of human mammary cells elucidates breast cancer origins.** *The Journal of clinical investigation* 2014, **124**(2):478-480.
185. Stern DF: **ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2008, **13**(2):215-223.
186. Jackson-Fisher AJ, Bellinger G, Breindel JL, Tavassoli FA, Booth CJ, Duong JK, Stern DF: **ErbB3 is required for ductal morphogenesis in the mouse mammary gland.** *Breast cancer research : BCR* 2008, **10**(6):R96.
187. Eirew P, Kannan N, Knapp DJ, Vaillant F, Emerman JT, Lindeman GJ, Visvader JE, Eaves CJ: **Aldehyde dehydrogenase activity is a biomarker of primitive normal human mammary luminal cells.** *Stem Cells* 2012, **30**(2):344-348.
188. Lucas JN, Rudmann DG, Credille KM, Irizarry AR, Peter A, Snyder PW: **The rat mammary gland: morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics.** *Toxicol Pathol* 2007, **35**(2):199-207.
189. Richert MM, Schwertfeger KL, Ryder JW, Anderson SM: **An atlas of mouse mammary gland development.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2000, **5**(2):227-241.
190. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM: **A developmental atlas of rat mammary gland histology.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2000, **5**(2):165-185.
191. Hvid H, Thorup I, Sjogren I, Oleksiewicz MB, Jensen HE: **Mammary gland proliferation in female rats: effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age.** *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 2012, **64**(4):321-332.

192. Sternlicht MD: **Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis.** *Breast cancer research : BCR* 2006, **8**(1):201.
193. Russo J, Russo IH: **Experimentally induced mammary tumors in rats.** *Breast cancer research and treatment* 1996, **39**(1):7-20.
194. Zhou H, Qin LQ, Tang FL, Ma DF, Wang PY, Wang Y: **Effect of milk on the 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene-induced mammary tumor model in rat.** *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2007, **45**(10):1868-1872.
195. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB: **Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA.** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2003, **51**(12):1681-1688.
196. Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemona A, Czyzewska J: **Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer.** *Anticancer research* 2009, **29**(8):3049-3052.
197. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR *et al*: **Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade.** *Breast cancer research : BCR* 2010, **12**(4):207.
198. Hughes K, Dobson JM: **Prognostic histopathological and molecular markers in feline mammary neoplasia.** *Vet J* 2012, **194**(1):19-26.
199. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V: **Classification and grading of canine mammary tumors.** *Veterinary pathology* 2011, **48**(1):117-131.
200. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, Glass A, Zehnbauser BA, Lister K, Parwaresch R: **Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2005, **18**(8):1067-1078.
201. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A: **Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method.** *Journal of comparative pathology* 2005, **133**(4):246-252.
202. Wiese DA, Thaiwong T, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kiupel M: **Feline mammary basal-like adenocarcinomas: a potential model for human triple-negative breast cancer (TNBC) with basal-like subtype.** *BMC cancer* 2013, **13**:403.
203. Zappulli V, De Cecco S, Trez D, Caliarì D, Aresu L, Castagnaro M: **Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in feline mammary tumours.** *Journal of comparative pathology* 2012, **147**(2-3):161-170.
204. Brunetti B, Asproni P, Beha G, Muscatello LV, Millanta F, Poli A, Benazzi C, Sarli G: **Molecular phenotype in mammary tumours of queens: correlation between primary tumour and lymph node metastasis.** *Journal of comparative pathology* 2013, **148**(2-3):206-213.
205. Matos AJ, Lopes C, Carvalheira J, Santos M, Rutteman GR, Gartner F: **E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables.** *Journal of comparative pathology* 2006, **134**(2-3):182-189.
206. Figueira AC, Teodosio AS, Carvalheira J, Lacerda M, de Matos A, Gartner F: **P-cadherin expression in feline mammary tissues.** *Veterinary medicine international* 2012, **2012**:687424.
207. Rasotto R, Caliarì D, Castagnaro M, Zanetti R, Zappulli V: **An Immunohistochemical study of HER-2 expression in feline mammary tumours.** *Journal of comparative pathology* 2011, **144**(2-3):170-179.
208. Flores AR, Rema A, Carvalho F, Faustino A, Dias Pereira P: **Reduced Expression of Claudin-2 is Associated with High Histological Grade and Metastasis of Feline Mammary Carcinomas.** *Journal of comparative pathology* 2013.

209. Misdorp W, Else R, Hellmen E, Lipscomb T: **Histologic Classification of Mammary Tumors of the Dog and the Cat**, vol. 7. Washington, DC: Armed Force Institute of Pathology and World Health Organization; 1999.
210. Costa I, Solanas M, Escrich E: **Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors**. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2002, **126**(8):915-927.
211. Mann PC, Boorman GA, Lolloi LO, McMnrtin DN, Goodman DG: **Proliferative Lesions of the Mammary Gland in Rats**. *Guides for Toxicologic Pathology Society of Toxicologic Pathologists/American Registry of Pathology/Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC* 1996, **IS-2**.
212. Perou CM, Borresen-Dale AL: **Systems biology and genomics of breast cancer**. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011, **3**(2).
213. Ellis MJ, Perou CM: **The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap**. *Cancer discovery* 2013, **3**(1):27-34.
214. Ciriello G, Sinha R, Hoadley KA, Jacobsen AS, Reva B, Perou CM, Sander C, Schultz N: **The molecular diversity of Luminal A breast tumors**. *Breast cancer research and treatment* 2013, **141**(3):409-420.
215. Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, Harrell JC, Roman E, Adamo B, Troester M *et al*: **Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes**. *Breast cancer research and treatment* 2013, **142**(2):237-255.
216. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011**. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2011, **22**(8):1736-1747.
217. Won JR, Gao D, Chow C, Cheng J, Lau SY, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS, Nielsen TO: **A survey of immunohistochemical biomarkers for basal-like breast cancer against a gene expression profile gold standard**. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2013, **26**(11):1438-1450.
218. Lim E, Wu D, Pal B, Bouras T, Asselin-Labat ML, Vaillant F, Yagita H, Lindeman GJ, Smyth GK, Visvader JE: **Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways**. *Breast cancer research : BCR* 2010, **12**(2):R21.
219. Panni RZ, Linehan DC, DeNardo DG: **Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer**. *Immunotherapy* 2013, **5**(10):1075-1087.
220. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhwani N, Keil SD, Junaid SA *et al*: **Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy**. *Cancer discovery* 2011, **1**(1):54-67.
221. Hayes DF: **Biomarkers**. In: *Cancer: Principles and practice of oncology*. edn. Edited by DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011: 694-701.
222. Brooks JD: **Translational genomics: the challenge of developing cancer biomarkers**. *Genome research* 2012, **22**(2):183-187.
223. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brunner N, Chan DW, Babaian R, Bast RC, Jr., Dowell B, Esteva FJ *et al*: **National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers**. *Clinical chemistry* 2008, **54**(12):e11-79.
224. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S: **American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer**. *Journal of oncology practice / American Society of Clinical Oncology* 2010, **6**(4):195-197.
225. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M: **Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients**. *British journal of cancer* 2007, **96**(10):1504-1513.

226. Ribeiro J, Sousa B, Cardoso F: **Optimal approach in early breast cancer: Adjuvant and neoadjuvant treatment.** *EJC Supplements* 2013, **11**:3-22.
227. Dias Pereira P, Carvalheira J, Gartner F: **Cell proliferation in feline normal, hyperplastic and neoplastic mammary tissue--an immunohistochemical study.** *Vet J* 2004, **168**(2):180-185.
228. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO *et al*: **Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011, **29**(32):4273-4278.
229. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T *et al*: **Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group.** *Journal of the National Cancer Institute* 2011, **103**(22):1656-1664.
230. Zhou L, Li K, Luo Y, Tian L, Wang M, Li C, Huang Q: **Novel prognostic markers for patients with triple-negative breast cancer.** *Human pathology* 2013, **44**(10):2180-2187.
231. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Bertucci F, Cabaud O, Wicinski J, Finetti P, Josselin E, Adelaide J, Nguyen TT, Monville F *et al*: **ALDH1-Positive Cancer Stem Cells Predict Engraftment of Primary Breast Tumors and Are Governed by a Common Stem Cell Program.** *Cancer research* 2013.
232. Rodrigues LR: **Significance of Osteopontin Expression in Human Invasive Breast Tumour Stroma.** *The Open Breast Cancer Journal* 2008, **1**:1-8.
233. Bayraktar S, Gluck S: **Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer.** *Breast cancer research and treatment* 2013, **138**(1):21-35.
234. Liu M, Mo QG, Wei CY, Qin QH, Huang Z, He J: **Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer: A meta-analysis.** *Oncology letters* 2013, **5**(3):983-991.
235. Poortmans P: **Optimal approach in early breast cancer: Radiation therapy.** *E J C Supplements* 2013, **11**:27-36.
236. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J *et al*: **Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials.** *Lancet* 2011, **378**(9804):1707-1716.
237. Teoh M, Clark CH, Wood K, Whitaker S, Nisbet A: **Volumetric modulated arc therapy: a review of current literature and clinical use in practice.** *The British journal of radiology* 2011, **84**(1007):967-996.
238. Szasz O, Szasz A: **Oncothermia – Nano-Heating Paradigm.** *J Cancer Sci Ther* 2014, **6**:117-127.
239. Roussakow S: **The History of Hyperthermia Rise and Decline.** *Conference Papers in Medicine* 2013, **2013**:1-40.
240. Cabuy E: **Hyperthermia in Cancer Treatment** *Reliable Cancer Therapies Energy-based therapies* 2011, **1**(2):1-48.
241. Overgaard J: **Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. A review and a hypothesis.** *Cancer* 1977, **39**(6):2637-2646.
242. Sardari D, Verga N: **Cancer Treatment with Hyperthermia.** In: *Current Cancer Treatment - Novel Beyond Conventional Approaches.* edn. Edited by Ozdemir PO: InTech; 2011.
243. Dietzel F: **Basic principles in hyperthermic tumor therapy.** *Recent Results Cancer Res* 1983, **86**:177-190.
244. van der Zee J: **Heating the patient: a promising approach?** *Annals of Oncology* 2002, **13**(8):1173-1184.
245. Chichef A, Skowronek J, Kubaszewska M, Kanikowski M: **Hyperthermia – description of a method and a review of clinical applications.** *Rep Pract Oncol Radiother* 2007, **12**(5):267-275.

246. Singh BB: **Hyperthermia: an ancient science in India**. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 1991, **7**(1):1-6.
247. Engin K: **Biological rationale and clinical experience with hyperthermia**. *Control Clin Trials* 1996, **17**(4):316-342.
248. Bickels J, Kollender Y, Merinsky O, Meller I: **Coley's toxin: historical perspective**. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 2002, **4**(6):471-472.
249. Luk KH, Hulse RM, Phillips TL: **Hyperthermia in cancer therapy**. *The Western journal of medicine* 1980, **132**(3):179-185.
250. Cavaliere R, Ciocatto EC, Giovannella BC, Heidelberger C, Johnson RO, Margottini M, Mondovi B, Moricca G, Rossi-Fanelli A: **Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies**. *Cancer* 1967, **20**(9):1351-1381.
251. Kim JH, Hahn EW, Tokita N, Nisce LZ: **Local tumor hyperthermia in combination with radiation therapy. 1. Malignant cutaneous lesions**. *Cancer* 1977, **40**(1):161-169.
252. Hobohm U: **Fever therapy revisited**. *British journal of cancer* 2005, **92**(3):421-425.
253. Falk MH, Issels RD: **Hyperthermia in Oncology**. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2001, **17**(1):1-18.
254. Thrall DE, Maccarini P, Stauffer P, Macfall J, Hauck M, Snyder S, Case B, Linder K, Lan L, McCall L *et al*: **Thermal dose fractionation affects tumour physiological response**. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2012, **28**(5):431-440.
255. Lagendijk JJ: **Hyperthermia treatment planning**. *Physics in medicine and biology* 2000, **45**(5):R61-76.
256. Kapp DS, Hahn GM, Carlson RW: **Principles of Hyperthermia**. In: *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5th edn. Edited by Bast RCJ, Kufe DW, Pollock RE; 2000.
257. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C: **Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors**. *The Journal of surgical research* 2005, **127**(2):208-223.
258. Torigoe T, Tamura Y, Sato N: **Heat shock proteins and immunity: application of hyperthermia for immunomodulation**. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2009, **25**(8):610-616.
259. Bicher HI, Hetzel FW, Sandhu TS, Frinak S, Vaupel P, O'Hara MD, O'Brien T: **Effects of hyperthermia on normal and tumor microenvironment**. *Radiology* 1980, **137**(2):523-530.
260. Issels RD: **Hyperthermia adds to chemotherapy**. *Eur J Cancer* 2008, **44**(17):2546-2554.
261. Amaya C, Kurisetty V, Stiles J, Nyakeriga AM, Arumugam A, Lakshmanaswamy R, Botez CE, Mitchell DC, Bryan BA: **A genomics approach to identify susceptibilities of breast cancer cells to "fever-range" hyperthermia**. *BMC cancer* 2014, **14**:81.
262. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H: **The cellular and molecular basis of hyperthermia**. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002, **43**(1):33-56.
263. Segal BH, Wang XY, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, Subjeck JR: **Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer**. *Drug discovery today* 2006, **11**(11-12):534-540.
264. Nguyen HT, Tran KK, Sun B, Shen H: **Activation of inflammasomes by tumor cell death mediated by gold nanoshells**. *Biomaterials* 2012, **33**(7):2197-2205.
265. Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW: **Temperature Matters! And Why it Should Matter to Tumor Immunologists**. *Cancer immunology research* 2013, **1**(4):210-216.
266. Chu KF, Dupuy DE: **Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy**. *Nature reviews Cancer* 2014, **14**(3):199-208.

267. Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T *et al*: **Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.** *Cell stress & chaperones* 2012, **17**(6):757-763.
268. Toraya-Brown S, Sheen MR, Zhang P, Chen L, Baird JR, Demidenko E, Turk MJ, Hoopes PJ, Conejo-Garcia JR, Fiering S: **Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8 T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors.** *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2014.
269. Rice GC, Gray JW, Dean PN, Dewey WC: **Fluorescence-activated cell sorting analysis of the induction and expression of acute thermal tolerance within the cell cycle.** *Cancer Res* 1984, **44**(6):2368-2376.
270. Gerweck LE: **Hyperthermia in cancer therapy: the biological basis and unresolved questions.** *Cancer Res* 1985, **45**(8):3408-3414.
271. Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C: **Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets?** *Biochimica et biophysica acta* 2011, **1816**(2):89-104.
272. Peterson HI: **Modification of tumour blood flow--a review.** *International journal of radiation biology* 1991, **60**(1-2):201-210.
273. Song CW: **Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review.** *Cancer Res* 1984, **44**(10 Suppl):4721s-4730s.
274. Woodhall B, Pickrell KL, Georgiade NG, Mahaley MS, Dukes HT: **Effect of hyperthermia upon cancer chemotherapy; application to external cancers of head and face structures.** *Annals of surgery* 1960, **151**:750-759.
275. Kim JH, Hahn EW, Tokita N: **Combination hyperthermia and radiation therapy for cutaneous malignant melanoma.** *Cancer* 1978, **41**(6):2143-2148.
276. Franckena M, Fatehi D, de Bruijne M, Canters RA, van Norden Y, Mens JW, van Rhoon GC, van der Zee J: **Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia.** *Eur J Cancer* 2009, **45**(11):1969-1978.
277. Franckena M, van der Zee J: **Use of combined radiation and hyperthermia for gynecological cancer.** *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2010, **22**(1):9-14.
278. Hurwitz MD, Hansen JL, Prokopios-Davos S, Manola J, Wang Q, Bornstein BA, Hynynen K, Kaplan ID: **Hyperthermia combined with radiation for the treatment of locally advanced prostate cancer: long-term results from Dana-Farber Cancer Institute study 94-153.** *Cancer* 2011, **117**(3):510-516.
279. Lammers RJ, Witjes JA, Inman BA, Leibovitch I, Laufer M, Nativ O, Colombo R: **The role of a combined regimen with intravesical chemotherapy and hyperthermia in the management of non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review.** *Eur Urol* 2011, **60**(1):81-93.
280. Ceelen WP, Van Nieuwenhove Y, Van Belle S, Denys H, Pattyn P: **Cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion in women with heavily pretreated recurrent ovarian cancer.** *Annals of surgical oncology* 2012, **19**(7):2352-2359.
281. Helm CW: **The role of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in ovarian cancer.** *The oncologist* 2009, **14**(7):683-694.
282. Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM *et al*: **Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study.** *Lancet Oncol* 2010, **11**(6):561-570.
283. Szasz ASNSO: **Oncothermia: Principles and Practices:** Springer; 2011.
284. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T: **Medical application of functionalized magnetic nanoparticles.** *J Biosci Bioeng* 2005, **100**(1):1-11.
285. Thrall DE, Dewhirst MW: **Use of radiation and/or hyperthermia for treatment of mast cell tumors and lymphosarcoma in dogs.** *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 1985, **15**(4):835-843.

286. Huang Q, Hu JK, Lohr F, Zhang L, Braun R, Lanzen J, Little JB, Dewhirst MW, Li CY: **Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy.** *Cancer Res* 2000, **60**(13):3435-3439.
287. Lohr F, Hu K, Huang Q, Zhang L, Samulski TV, Dewhirst MW, Li CY: **Enhancement of radiotherapy by hyperthermia-regulated gene therapy.** *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2000, **48**(5):1513-1518.
288. Walther W, Stein U: **Heat-responsive gene expression for gene therapy.** *Adv Drug Deliv Rev* 2009, **61**(7-8):641-649.
289. Gerner EW, Hersh EM, Pennington M, Tsang TC, Harris D, Vasanwala F, Brailey J: **Heat-inducible vectors for use in gene therapy.** *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2000, **16**(2):171-181.
290. Braiden V, Ohtsuru A, Kawashita Y, Miki F, Sawada T, Ito M, Cao Y, Kaneda Y, Koji T, Yamashita S: **Eradication of breast cancer xenografts by hyperthermic suicide gene therapy under the control of the heat shock protein promoter.** *Human gene therapy* 2000, **11**(18):2453-2463.
291. Page RL, Thrall DE: **Clinical indications and applications of radiotherapy and hyperthermia in veterinary oncology.** *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 1990, **20**(4):1075-1092.
292. Dewhirst MW, Sim DA: **Analysis of prognostic variables which influence early and long-term response of pet animal tumors to radiation alone and radiation plus heat.** *Frontiers of radiation therapy and oncology* 1984, **18**:47-55.
293. Gillette EL: **Large animal studies of hyperthermia and irradiation.** *Cancer Res* 1979, **39**(6 Pt 2):2242-2244.
294. Grier RL, Brewer WG, Jr., Theilen GH: **Hyperthermic treatment of superficial tumors in cats and dogs.** *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1980, **177**(3):227-233.
295. Brewer WG, Jr., Turrel JM: **Radiotherapy and hyperthermia in the treatment of fibrosarcomas in the dog.** *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1982, **181**(2):146-150.
296. Legorreta RA, Denman DL, Kelley MC, Lewis GC, Jr.: **Use of hyperthermia and radiotherapy in treatment of a large mast cell sarcoma in a dog.** *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1988, **193**(12):1545-1548.
297. Gillette EL: **Hyperthermia effects in animals with spontaneous tumors.** *National Cancer Institute monograph* 1982, **61**:361-364.
298. Smrkovski OA, Koo Y, Kazemi R, Lembcke LM, Fathy A, Liu Q, Phillips JC: **Performance characteristics of a conformal ultra-wideband multilayer applicator (CUMLA) for hyperthermia in veterinary patients: a pilot evaluation of its use in the adjuvant treatment of non-resectable tumours.** *Veterinary and comparative oncology* 2013, **11**(1):14-29.
299. Ahuja AA, Bumb RA, Mehta RD, Prasad N, Tanwar RK, Satoskar AR: **Successful treatment of canine cutaneous leishmaniasis using radio-frequency induced heat (RFH) therapy.** *The American journal of tropical medicine and hygiene* 2012, **87**(2):261-263.
300. Bumb RA, Prasad N, Khandelwal K, Aara N, Mehta RD, Ghiya BC, Salotra P, Wei L, Peters S, Satoskar AR: **Long-term efficacy of single-dose radiofrequency-induced heat therapy vs. intralesional antimonials for cutaneous leishmaniasis in India.** *The British journal of dermatology* 2013, **168**(5):1114-1119.
301. Habash RW, Bansal R, Krewski D, Alhafid HT: **Thermal therapy, part 2: hyperthermia techniques.** *Critical reviews in biomedical engineering* 2006, **34**(6):491-542.
302. Sharifi I, Shokrollahi H, Amiri S: **Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications.** *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2012, **324**(6):903-915.
303. Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A: **Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer.** *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2010, **26**(8):790-795.

304. Medeiros SF, Santos AM, Fessi H, Elaissari A: **Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications**. *Int J Pharm* 2011, **403**(1-2):139-161.
305. Pillai G, Ceballos-Coronel ML: **Science and technology of the emerging nanomedicines in cancer therapy: A primer for physicians and pharmacists** *SAGE Open Medicine* 2013, **1**: **2050312113513759**:1-17.
306. Chalkidou A, Simeonidis K, Angelakeris M, Samaras T, Martinez-Boubeta C, Balcells L, Papazisis K, Dendrinou-Samara C, Kalogirou O: **In vitro application of Fe/MgO nanoparticles as magnetically mediated hyperthermia agents for cancer treatment**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2011, **323**(6):775-780.
307. Martinez-Boubeta C, Balcells L, Cristofol R, Sanfeliu C, Rodriguez E, Weissleder R, Lope-Piedrafita S, Simeonidis K, Angelakeris M, Sandiumenge F *et al*: **Self-assembled multifunctional Fe/MgO nanospheres for magnetic resonance imaging and hyperthermia**. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2010, **6**(2):362-370.
308. Habash RW, Bansal R, Krewski D, Alhafid HT: **Thermal therapy, Part IV: electromagnetic and thermal dosimetry**. *Critical reviews in biomedical engineering* 2007, **35**(1-2):123-182.
309. Bretcanu O, Verné E, Cöisson M, Tiberto P, Allia P: **Magnetic properties of the ferrimagnetic glass-ceramics for hyperthermia**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2006, **305**(2):529-533.
310. Craciunescu OI, Thrall DE, Vujaskovic Z, Dewhirst MW: **Magnetic resonance imaging: a potential tool in assessing the addition of hyperthermia to neoadjuvant therapy in patients with locally advanced breast cancer**. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2010, **26**(7):625-637.
311. Hegyi G, Szigeti GP, Szasz A: **Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy**. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013, **2013**:672873.
312. Onoyama M, Tsuka T, Imagawa T, Osaki T, Minami S, Azuma K, Kawashima K, Ishi H, Takayama T, Ogawa N *et al*: **Photodynamic hyperthermal chemotherapy with indocyanine green: a novel cancer therapy for 16 cases of malignant soft tissue sarcoma**. *Journal of veterinary science* 2014, **15**(1):117-123.
313. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A: **Vitamin D and cancer**. *Frontiers in endocrinology* 2012, **3**:58.
314. Reports IWG: **Vitamin D and Cancer**, vol. 5: WORLD HEALTH ORGANIZATION International Agency for Research on Cancer; 2008.
315. Welsh J: **Vitamin D metabolism in mammary gland and breast cancer**. *Molecular and cellular endocrinology* 2011, **347**(1-2):55-60.
316. Lopes N, Paredes J, Costa JL, Ylstra B, Schmitt F: **Vitamin D and the mammary gland: a review on its role in normal development and breast cancer**. *Breast cancer research : BCR* 2012, **14**(3):211.
317. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y: **Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms**. *The Biochemical journal* 2012, **441**(1):61-76.
318. Beer TM, Myrthue A: **Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic**. *Molecular cancer therapeutics* 2004, **3**(3):373-381.
319. Shao T, Klein P, Grossbard ML: **Vitamin D and breast cancer**. *The oncologist* 2012, **17**(1):36-45.
320. Petkovich M, Helvig C, Epps T: **CYP24A1 Regulation in Health and Disease** In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1525-1554.
321. Moukayed M, Grant WB: **Molecular link between vitamin D and cancer prevention**. *Nutrients* 2013, **5**(10):3993-4021.
322. Vieth R: **The Pharmacology of Vitamin D**. In: *Vitamin D. Volume 1*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1041-1066.

323. van de Peppel J, van Leeuwen JP: **Vitamin D and gene networks in human osteoblasts.** *Frontiers in physiology* 2014, **5**:137.
324. Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS: **Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2010, **121**(1-2):372-375.
325. Kouzmenko A, Ohtake F, Fujiki R, Kato S: **Epigenetic Modifications in Vitamin D Receptor-mediated Transrepression.** In: *Vitamin D. Volume 1*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 227-234.
326. Mizwicki MT, Norman AW: **Vitamin D Sterol/VDR Conformational Dynamics and Nongenomic Actions.** In: *Vitamin D. Volume 1*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 271-300.
327. Giovannucci E: **The Epidemiology of Vitamin D and Cancer Risk** In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1569-1590.
328. Welsh J: **Vitamin D Actions in Mammary Gland and Breast Cancer.** In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1657-1674.
329. Oikawa T, Yoshida Y, Shimamura M, Ashino-Fuse H, Iwaguchi T, Tominaga T: **Antitumor effect of 22-oxa-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, a potent angiogenesis inhibitor, on rat mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.** *Anti-cancer drugs* 1991, **2**(5):475-480.
330. Studzinski GP, Gocek E, Danilenko M: **Vitamin D Effects on Differentiation and Cell Cycle** In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1625-1656.
331. Leeuwen JPTMv, Driel Mv, Feldman D, Muñoz A: **Vitamin D: Cancer and Differentiation.** In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1591-1624.
332. Hendy GN, Kremer R, Goltzman D: **Contributions of Genetically Modified Mouse Models to Understanding the Physiology and Pathophysiology of the 25-Hydroxyvitamin D-1-Alpha Hydroxylase Enzyme (1a(OH)ase) and the Vitamin D Receptor (VDR).** In: *Vitamin D. Volume 1*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 583-606.
333. Bouillon R: **How to Define Optimal Vitamin D Status.** In: *Vitamin D. Volume 1*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1067-1088.
334. Weinstein BM, Epstein S: **Drug and Hormone Effects on Vitamin D Metabolism.** In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1245-1290.
335. Roberts SJ, Chen Y, Moesen M, Schrooten J, Luyten FP: **Enhancement of osteogenic gene expression for the differentiation of human periosteal derived cells.** *Stem cell research* 2011, **7**(2):137-144.
336. Cox RF, Morgan MP: **Microcalcifications in breast cancer: Lessons from physiological mineralization.** *Bone* 2013, **53**(2):437-450.
337. Song I, Kim BS, Kim CS, Im GI: **Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 2011, **408**(1):126-131.
338. Singh A, Morris RJ: **The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer.** *Cytokine & growth factor reviews* 2010, **21**(4):299-313.
339. Gupta A, Leong DT, Bai HF, Singh SB, Lim TC, Hutmacher DW: **Osteo-maturation of adipose-derived stem cells required the combined action of vitamin D3, beta-glycerophosphate, and ascorbic acid.** *Biochemical and biophysical research communications* 2007, **362**(1):17-24.
340. Scimeca M, Giannini E, Antonacci C, Pistolesse CA, Spagnoli LG, Bonanno E: **Microcalcifications in breast cancer: an active phenomenon mediated by epithelial cells with mesenchymal characteristics.** *BMC cancer* 2014, **14**(1):286.
341. Bellahcene A, Castronovo V: **Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer.** *The American journal of pathology* 1995, **146**(1):95-100.

342. Donnelly E, Boskey AL: **Mineralization**. In: *Vitamin D. Volume 1*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 381-402.
343. Bramwell VH, Tuck AB, Chapman JA, Anborgh PH, Postenka CO, Al-Katib W, Shepherd LE, Han L, Wilson CF, Pritchard KI *et al*: **Assessment of osteopontin in early breast cancer: correlative study in a randomised clinical trial**. *Breast cancer research : BCR* 2014, **16**(1):R8.
344. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J: **Osteopontin--a molecule for all seasons**. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2002, **95**(1):3-13.
345. Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Mansson H: **The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer**. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2007, **16**(6):1087-1097.
346. Marxfeld H, Staedtler F, Harleman JH: **Characterisation of two rat mammary tumour models for breast cancer research by gene expression profiling**. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 2006, **58**(2-3):133-143.
347. Koszewski NJ, Reinhardt TA, Horst RL: **Vitamin D receptor interactions with the murine osteopontin response element**. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1996, **59**(5-6):377-388.
348. Khanna-Jain R, Vuorinen A, Sandor GK, Suuronen R, Miettinen S: **Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells**. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2010, **122**(4):133-141.
349. Srisawasdi S, Pavasant P: **Different roles of dexamethasone on transforming growth factor-beta1-induced fibronectin and nerve growth factor expression in dental pulp cells**. *Journal of endodontics* 2007, **33**(9):1057-1060.
350. Sambrook P: **Glucocorticoids and Vitamin D**. In: *Vitamin D. Volume 2*, 3 edn. Edited by Feldman D PJ, Adams JS: Elsevier Academic press; 2011: 1233-1244.
351. Cardiff RD, Kenney N: **A compendium of the mouse mammary tumor biologist: from the initial observations in the house mouse to the development of genetically engineered mice**. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011, **3**(6).
352. Cardiff RD, Kenney N: **Mouse mammary tumor biology: a short history**. *Advances in cancer research* 2007, **98**:53-116.
353. Daniel PM, Prichard MM: **Three Types of Mammary Tumour Induced in Rats by Feeding with Dmba**. *British journal of cancer* 1964, **13**:513-520.
354. Middleton PJ: **The histogenesis of mammary tumours induced in the rat by chemical carcinogens**. *British journal of cancer* 1965, **19**(4):830-839.
355. Hirst GL, Balmain A: **Forty years of cancer modelling in the mouse**. *Eur J Cancer* 2004, **40**(13):1974-1980.
356. Huggins C, Grand LC, Brillantes FP: **Mammary Cancer Induced by a Single Feeding of Polynuclear Hydrocarbons, and its Suppression**. *Nature* 1961, **189**:204-207.
357. Hanahan D, Wagner EF, Palmiter RD: **The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer**. *Genes & development* 2007, **21**(18):2258-2270.
358. Hann B, Balmain A: **Building 'validated' mouse models of human cancer**. *Current opinion in cell biology* 2001, **13**(6):778-784.
359. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S *et al*: **Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors**. *Genome biology* 2007, **8**(5):R76.
360. Matulka LA, Wagner KU: **Models of breast cancer**. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2005, **2**:1-6.
361. Kim JB, O'Hare MJ, Stein R: **Models of breast cancer: is merging human and animal models the future?** *Breast cancer research : BCR* 2004, **6**(1):22-30.

362. Wagner KU: **Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling?** *Breast cancer research : BCR* 2004, **6**(1):31-38.
363. Dias M, Cabrita S, Sousa E, Franca B, Patricio J, Oliveira C: **Benign and malignant mammary tumors induced by DMBA in female Wistar rats.** *European journal of gynaecological oncology* 1999, **20**(4):285-288.
364. Liska J, Galbavy S, Macejova D, Zlatos J, Brtko J: **Histopathology of mammary tumours in female rats treated with 1-methyl-1-nitrosourea.** *Endocrine regulations* 2000, **34**(2):91-96.
365. Thompson HJ, Singh M: **Rat models of premalignant breast disease.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2000, **5**(4):409-420.
366. Medina DaT, H.J.: **A comparison of the salient features of mouse, rat, and human mammary tumorigenesis.** In: *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research.* edn. Edited by Margot MI, Bonnie BA: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000.
367. Dias MF, Sousa E, Cabrita S, Patricio J, Oliveira CF: **Chemoprevention of DMBA-Induced Mammary Tumors in Rats by a Combined Regimen of Alpha-Tocopherol, Selenium, and Ascorbic Acid.** *The breast journal* 2000, **6**(1):14-19.
368. Borowsky A: **Special considerations in mouse models of breast cancer.** *Breast disease* 2007, **28**:29-38.
369. Cardiff RD, Munn RJ: **Comparative pathology of mammary tumorigenesis in transgenic mice.** *Cancer letters* 1995, **90**(1):13-19.
370. Zarbl H: **Toxicogenomic analyses of genetic susceptibility to mammary gland carcinogenesis in rodents: implications for human breast cancer.** *Breast disease* 2007, **28**:87-105.
371. Shull JD: **The rat oncogenome: comparative genetics and genomics of rat models of mammary carcinogenesis.** *Breast disease* 2007, **28**:69-86.
372. Sukumar S, McKenzie K, Chen Y: **Animal models for breast cancer.** *Mutation research* 1995, **333**(1-2):37-44.
373. Tsubura A, Izuno Y, Shoji T, Kusunose N, Morii S: **Influence of strain and sex on the local development of mammary tumors induced by direct application of DMBA powder to rat mammary glands.** *Acta pathologica japonica* 1990, **40**(1):9-13.
374. Hennighausen L: **Mouse models for breast cancer.** *Breast cancer research : BCR* 2000, **2**(1):2-7.
375. Cos S, Mediavilla D, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Barcelo EJ: **Exposure to light-at-night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats.** *Cancer letters* 2006, **235**(2):266-271.
376. Thompson H: **Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenzanthracene or 1-methyl-1-nitrosourea.** In: *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer* edn. Edited by Ip MM, Ash BB: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000.
377. Medina D: **Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands.** *Breast disease* 2007, **28**:63-68.
378. Currier N, Solomon SE, Demicco EG, Chang DL, Farago M, Ying H, Dominguez I, Sonenshein GE, Cardiff RD, Xiao ZX *et al*: **Oncogenic signaling pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors.** *Toxicol Pathol* 2005, **33**(6):726-737.
379. Thompson HJ, Sporn MB: **Mammary Cancer in Rats.** In: *Tumor Models in Cancer Research.* edn. Edited by Teicher BA: Humana Press Inc.; 2002: 173-182.
380. Gajjar K, Martin-Hirsch PL, Martin FL: **CYP1B1 and hormone-induced cancer.** *Cancer letters* 2012, **324**(1):13-30.
381. IARC: **Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures.** *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer* 2010, **92**:1-853.

382. Daniel FB, Joyce NJ: **7,12-Dimethylbenz[a]anthracene--DNA adducts in Sprague-Dawley and Long-Evans female rats: the relationship of DNA adducts to mammary cancer.** *Carcinogenesis* 1984, **5(8)**:1021-1026.
383. Shan L, Yu M, Snyderwine EG: **Global gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland carcinomas and adenomas.** *Toxicologic Pathology* 2005, **33(7)**:768-775.
384. Russo J, Russo IH: **Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 2000, **5(2)**:187-200.
385. Barros AC, Muranaka EN, Mori LJ, Pelizon CH, Iriya K, Giocondo G, Pinotti JA: **Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.** *Revista do Hospital das Clinicas* 2004, **59(5)**:257-261.
386. Ellis IO, al e: **Tumours of the breast.** In: *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs.* Edited by Tavassoli FA, Devilee P: IARC Press; 2003: 9-112.
387. Cardiff RD: **Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: comparative pathology.** *Microscopy research and technique* 2001, **52(2)**:224-230.
388. Cardiff RD, Wellings SR: **The comparative pathology of human and mouse mammary glands.** *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1999, **4(1)**:105-122.
389. Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, Rehm S, Russo J, Tavassoli FA, Wakefield LM *et al*: **The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting.** *Oncogene* 2000, **19(8)**:968-988.
390. Lopes AC, Cova TF, Pais AA, Pereira JL, Colaco B, Cabrita AM: **Improving discrimination in the grading of rat mammary tumors using two-dimensional mapping of histopathological observations.** *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 2014, **66(1)**:73-80.
391. Choi EJ, Kim GH: **Anticancer mechanism of equol in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-treated animals.** *International journal of oncology* 2011, **39(3)**:747-754.
392. Shan L, He M, Yu M, Qiu C, Lee NH, Liu ET, Snyderwine EG: **cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.** *Carcinogenesis* 2002, **23(10)**:1561-1568.
393. Souda M, Umekita Y, Abeyama K, Yoshida H: **Gene expression profiling during rat mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009, **125(6)**:1285-1297.
394. Cora MC, King D, Betz LJ, Wilson R, Travlos GS: **Artifactual changes in Sprague-Dawley rat hematologic parameters after storage of samples at 3 degrees C and 21 degrees C.** *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2012, **51(5)**:616-621.
395. Giknis M, Clifford C: **Clinical Laboratory Parameters for Crl:WI(Han):** Charles River; 2008.
396. Portela A, Vasconcelos M, Branco R, Gartner F, Faria M, Cavalheiro J: **An in vitro and in vivo investigation of the biological behavior of a ferrimagnetic cement for highly focalized thermotherapy.** *Journal of materials science Materials in medicine* 2010, **21(8)**:2413-2423.
397. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL *et al*: **Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999.** *Archives of pathology & laboratory medicine* 2000, **124(7)**:966-978.
398. Jolliffe I: **Principal component analysis**, vol. 2: New York: Springer; 2002.
399. Wang X, Paliwal K: **Feature extraction and dimensionality reduction algo-rithms and their applications in vowel recognition.** *Pattern Recognition* 2003, **36(10)**:2429-2439.
400. Kokot S, Grigg M, Panayiotou H, Phuong T: **Data interpretation by some commonchemometrics methods** *Electroanalysis* 1998, **10(16)**:1081-1088.

401. Campanella L, Angelis GD, Visco G: **Chemometric investigation of the efficiency of different TiO₂-based catalysts as principal components of TOC photo-chemical sensors under development** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003, **376(4)**:467-475.
402. Polat K, Günes S: **Computer aided medical diagnosis system based on principal component analysis and artificial immune recognition system classifier algorithm.** *Expert Systems with Applications* 2008, **34(1)**:773-779.
403. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J: **Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis.** *Analytica chimica acta* 2010, **659(1-2)**:23-33.
404. Selaru FM, Yin J, Olaru A, Mori Y, Xu Y, Epstein SH, Sato F, Deacu E, Wang S, Sterian A *et al*: **An unsupervised approach to identify molecular phenotypic components influencing breast cancer features.** *Cancer research* 2004, **64(5)**:1584-1588.
405. Cheng LL, Burns MA, Taylor JL, He W, Halpern EF, McDougal WS, Wu CL: **Metabolic characterization of human prostate cancer with tissue magnetic resonance spectroscopy.** *Cancer research* 2005, **65(8)**:3030-3034.
406. Mendez E, Houck JR, Doody DR, Fan W, Lohavanichbutr P, Rue TC, Yueh B, Futran ND, Upton MP, Farwell DG *et al*: **A genetic expression profile associated with oral cancer identifies a group of patients at high risk of poor survival.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15(4)**:1353-1361.
407. Spratlin JL, Serkova NJ, Eckhardt SG: **Clinical applications of metabolomics in oncology: a review.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15(2)**:431-440.
408. Edefonti V, Bravi F, Garavello W, La Vecchia C, Parpinel M, Franceschi S, Dal Maso L, Bosetti C, Boffetta P, Ferraroni M *et al*: **Nutrient-based dietary patterns and laryngeal cancer: evidence from an exploratory factor analysis.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2010, **19(1)**:18-27.
409. Badowska-Kozakiewicz AM, Malicka E: **Immunohistochemical evaluation of expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in mammary gland neoplasms in bitches.** *Polish journal of veterinary sciences* 2012, **15(2)**:209-214.
410. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Srivastava AN, Makker A, Goel MM: **Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast.** *Indian journal of cancer* 2013, **50(3)**:239-244.
411. Portela A, Vasconcelos M, Fernandes MH, Garcia M, Silva A, Gabriel J, Gartner F, Amorim I, Cavaleiro J: **Highly focalised thermotherapy using a ferrimagnetic cement in the treatment of a melanoma mouse model by low temperature hyperthermia.** *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2013, **29(2)**:121-132.
412. Sengupta P: **The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's.** *International journal of preventive medicine* 2013, **4(6)**:624-630.
413. Aleman CL, Mas RM, Rodeiro I, Noa M, Hernandez C, Menendez R, Gamez R: **Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months.** *Laboratory animals* 1998, **32(4)**:457-466.
414. Sharp P, Regina M: **The Laboratory Rat:** CRC Press LLC; 1998.
415. Aleman CL, Noa M, Mas R, Rodeiro I, Mesa R, Menendez R, Gamez R, Hernandez C: **Reference data for the principal physiological indicators in three species of laboratory animals.** *Laboratory animals* 2000, **34(4)**:379-385.
416. Kerr MG: **Veterinary Laboratory Medicine: Clinical biochemistry and Haematology:** Blackwell Science Ltd; 2002.

417. Bain PJ: **Liver**. In: *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology*. 5th edn. Edited by Latimer KS: Wiley-Blackwell; 2012: 211-230.
418. Brockus CW: **Erythrocytes**. In: *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology*. 5th edn. Edited by Latimer KS: Wiley-Blackwell; 2012: 3-44.
419. Krimer PM: **Generating and interpreting test results: test validity, quality control, reference values and basic epidemiology**. In: *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology*. 5th edn. Edited by Latimer KS: Wiley-Blackwell; 2012: 365-382.
420. Tarpley HL, Bounous DI: **Digestive system**. In: *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology*. 5th edn. Edited by Latimer KS: Wiley-Blackwell; 2012: 231-251.
421. Tripathi NK, Gregory CR, Latimer KS: **Urinary system**. In: *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology*. 5th edn. Edited by Latimer KS: Wiley-Blackwell; 2012: 253-282.
422. Webb JL, Latimer KS: **Leucocytes**. In: *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology*. 5th edn. Edited by Latimer KS: Wiley-Blackwell; 2012: 45-82.
423. Medina D: **Preneoplastic lesions in murine mammary cancer**. *Cancer research* 1976, **36**(7 PT 2):2589-2595.
424. Conklin MW, Keely PJ: **Why the stroma matters in breast cancer: insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers**. *Cell adhesion & migration* 2012, **6**(3):249-260.
425. Ramirez RA, Lee A, Schedin P, Russell JS, Masso-Welch PA: **Alterations in mast cell frequency and relationship to angiogenesis in the rat mammary gland during windows of physiologic tissue remodeling**. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2012, **241**(5):890-900.
426. Lilla JN, Werb Z: **Mast cells contribute to the stromal microenvironment in mammary gland branching morphogenesis**. *Developmental biology* 2010, **337**(1):124-133.
427. Taylor CR, Levenson RM: **Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II**. *Histopathology* 2006, **49**(4):411-424.
428. van Diest PJ, van Dam P, Henzen-Logmans SC, Berns E, van der Burg ME, Green J, Vergote I: **A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Gynaecological Cancer Cooperative Group**. *Journal of clinical pathology* 1997, **50**(10):801-804.
429. Walker RA: **Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I**. *Histopathology* 2006, **49**(4):406-410.
430. Allred DC: **The utility of conventional and molecular pathology in managing breast cancer**. *Breast cancer research : BCR* 2008, **10** Suppl 4:S4.
431. Vanmuylder N, Evrard L, Daelemans P, Dourov N: **Chaperones in the parotid gland: localization of heat shock proteins in human adult salivary glands**. *Cells, tissues, organs* 2000, **167**(2-3):199-205.
432. Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Della Salda L: **Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours**. *BMC cancer* 2006, **6**:171.
433. Shan L, Yu M, Snyderwine EG: **Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland cancer**. *Carcinogenesis* 2005, **26**(2):503-509.
434. Kawaguchi H, Umekita Y, Yoshida H: **Effects of 4-n-octylphenol on the induction of mammary tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rats**. *Veterinary pathology* 2009, **46**(2):334-342.
435. Mafuvadze B, Benakanakere I, Lopez Perez FR, Besch-Williford C, Ellersieck MR, Hyder SM: **Apigenin prevents development of medroxyprogesterone acetate-accelerated 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats**. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011, **4**(8):1316-1324.

436. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO: **Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008, **26**(19):3153-3158.
437. Tijerina AJ: **The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia.** *Dimensions of critical care nursing : DCCN* 2004, **23**(6):237-243.
438. Muscaritoli M, Costelli P, Aversa Z, Bonetto A, Baccino FM, Rossi Fanelli F: **New strategies to overcome cancer cachexia: from molecular mechanisms to the 'Parallel Pathway'.** *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 2008, **17** Suppl 1:387-390.
439. Biesterfeld S, Noll I, Noll E, Wohltmann D, Bäcking A: **Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer.** *Human pathology* 1995, **26**(1):47-52.
440. Harvey JM, Klerk NHD, Robbins PD, Sterrett GF: **Histological grading of breast cancer: a study of reproducibility of consensus grading.** *The Breast* 1995, **4**(4):297-300.
441. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis I, Elston C: **Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserver agreement.** *Human pathology* 1995, **26**(8):873-879.
442. Collan YUI, Kuopio T, Baak JPA, Becker R, Bogomoletz WV, Deverell M, Van Diest P, Van Galen C, Gilchrist K, Javed A *et al*: **Standardized Mitotic Counts in Breast Cancer Evaluation of the Method.** *Pathology - Research and Practice* 1996, **192**(9):931-941.
443. Samoszuk M, Kanakubo E, Chan JK: **Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts.** *BMC cancer* 2005, **5**:121.
444. Vargas-Roig LM, Fanelli MA, Lopez LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR: **Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples.** *Cancer detection and prevention* 1997, **21**(5):441-451.
445. Tavassoli F, Devilee P: **Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs**, vol. 4. Lyon: World Health Organization; 2003.
446. Miller MA, Mohammed SI: **In pursuit of a prognostic marker in canine mammary tumors.** *Vet J* 2011, **189**(3):245.
447. Ribeiro GM, Bertagnolli AC, Rocha RM, Cassali GD: **Morphological aspects and immunophenotypic profiles of mammary carcinomas in benign-mixed tumors of female dogs.** *Veterinary medicine international* 2012, **2012**:432763.
448. **Inflammation and Repair.** In: *Robbins Basic Pathology*. 9th edn. Edited by Kumar V, Abbas AK, Aster JC: Elsevier Saunders; 2013: 29-73.
449. Lee CT, Repasky EA: **Opposing roles for heat and heat shock proteins in macrophage functions during inflammation: a function of cell activation state?** *Frontiers in immunology* 2012, **3**:140.
450. Schildkopf P, Frey B, Ott OJ, Rubner Y, Multhoff G, Sauer R, Fietkau R, Gaipl US: **Radiation combined with hyperthermia induces HSP70-dependent maturation of dendritic cells and release of pro-inflammatory cytokines by dendritic cells and macrophages.** *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 2011, **101**(1):109-115.
451. Mace TA, Zhong L, Kokolus KM, Repasky EA: **Effector CD8+ T cell IFN-gamma production and cytotoxicity are enhanced by mild hyperthermia.** *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2012, **28**(1):9-18.
452. Schiaffonati L, Maroni P, Bendinelli P, Tiberio L, Piccoletti R: **Hyperthermia induces gene expression of heat shock protein 70 and phosphorylation of mitogen activated protein kinases in the rat cerebellum.** *Neurosci Lett* 2001, **312**(2):75-78.
453. Christians ES, Benjamin IJ: **The stress or heat shock (HS) response: insights from transgenic mouse models.** *Methods* 2005, **35**(2):170-175.

454. Li Y, Subjeck J, Yang G, Repasky E, Wang XY: **Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy.** *Vaccine* 2006, **24**(25):5360-5370.
455. Jolesch A, Elmer K, Bendz H, Issels RD, Noessner E: **Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system.** *Eur J Cell Biol* 2012, **91**(1):48-52.
456. Arya R, Mallik M, Lakhota SC: **Heat shock genes - integrating cell survival and death.** *Journal of biosciences* 2007, **32**(3):595-610.
457. Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H: **Intratumoral injection of immature dendritic cells enhances antitumor effect of hyperthermia using magnetic nanoparticles.** *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2005, **116**(4):624-633.
458. Muthana M, Multhoff G, Pockley AG: **Tumour infiltrating host cells and their significance for hyperthermia.** *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2010, **26**(3):247-255.
459. Minet-Quinard R, Moinard C, Walrand S, Villie F, Normand B, Vasson MP, Chopineau J, Cynober L: **Induction of a catabolic state in rats by dexamethasone: dose or time dependency?** *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 2000, **24**(1):30-36.
460. Tang X, Meng H: **Osteogenic induction and 1,25-dihydroxyvitamin D3 oppositely regulate the proliferation and expression of RANKL and the vitamin D receptor of human periodontal ligament cells.** *Archives of oral biology* 2009, **54**(7):625-633.
461. Noguchi R, Kubota H, Yugi K, Toyoshima Y, Komori Y, Soga T, Kuroda S: **The selective control of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenesis by temporal insulin patterns.** *Molecular systems biology* 2013, **9**:664.
462. Ferreira LM: **Cancer metabolism: the Warburg effect today.** *Experimental and molecular pathology* 2010, **89**(3):372-380.
463. Dell'Antone P: **Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects?** *Medical hypotheses* 2012, **79**(3):388-392.
464. Brito GA, Falcao JL, Saraiva SN, Lima AA, Flores CA, Ribeiro RA: **Histopathological analysis of rat mesentery as a method for evaluating neutrophil migration: differential effects of dexamethasone and pertussis toxin.** *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 1998, **31**(10):1319-1327.