

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CÍNTIA SUZANE DIAS DE MORAIS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS CONEXINAS
26, 32, 43 E PANEXINA-1 EM LINHAGENS DE CÉLULAS MAMÁRIAS
CANINA E HUMANA**

ILHÉUS – BAHIA

2018

CÍNTIA SUZANE DIAS DE MORAIS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS CONEXINAS
26, 32, 43 E PANEXINA-1 EM LINHAGENS DE CÉLULAS MAMÁRIAS
CANINA E HUMANA**

Tese apresentada à Universidade Estadual de
Santa Cruz como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau

ILHÉUS – BAHIA

2018

M827 Morais, Cíntia Suzane Dias de.
 Identificação e caracterização da expressão das
 conexinas 26, 32, 43 e panexina-1 em linhagens de
 células mamárias canina e humana / Cíntia Suzane
 Dias de Morais. – Ilhéus, BA: UESC, 2018.
 vii, 45 f. : il. ; anexo.

 Orientador: Amauri Arias Wenceslau.
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual
 de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
 Ciência Animal.

 Inclui referências bibliográficas e apêndice.

 1. Cães – Doenças. 2. Mamas – Doenças. 3.
 Tumores. 3. Patologia clínica veterinária. I. Título.

CDD 636.70896

CÍNTIA SUZANE DIAS DE MORAIS

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS CONEXINAS
26, 32, 43 E PANEXINA-1 EM LINHAGENS DE CÉLULAS MAMÁRIAS
CANINA E HUMANA**

Ilhéus – BA, 19/01/2018

Amauri Arias Wenceslau – *DSc*
UESC/DCAA (Orientador)

Débora Diniz Bezerra – *DSc*
UESB/DCB

Aline Oliveira da Conceição – *DSc*
UESC/DCB

Juneo Freitas Silva – *DSc*
UESC/DCB

Fábio Santos Carvalho – *DSc*
UESC/DCAA

**ILHÉUS – BAHIA
2018**

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS CONEXINAS 26, 32, 43 E PANEXINA-1 EM LINHAGENS DE CÉLULAS MAMÁRIAS CANINA E HUMANA

RESUMO

As conexinas, proteínas formadoras de junções gap, são fortemente implicadas na manutenção da homeostase tecidual devido à importante função de comunicação intercelular. As panexinas, proteínas formadoras de hemicanais, foram descobertas a pouco mais de uma década e não têm seu papel bem compreendido. São descritas diversas alterações nas conexinas durante o processo da carcinogênese e relaciona-se a panexina1 ao processo oncogênico. Considera-se a diminuição da expressão das conexinas ou a deficiência na sua capacidade de comunicação intercelular como o evento mais comumente associado às neoplasias. Além disso, pode ocorrer a localização citoplasmática incomum destas proteínas em células cancerosas. As conexinas 26, 32 e 43 podem ser observadas em glândulas mamárias de roedores e humanos, mas durante processos neoplásicos a expressão destas proteínas pode variar. Neoplasias mamárias são o segundo tipo de câncer mais freqüente em cadelas e são responsáveis por 50% dos casos malignos. Neste contexto, objetivou-se identificar a presença de panexina 1 em tecido mamário hígido e neoplásico de cadelas e identificar a presença de Cx26, 32 e 43 e panexina 1 em linhagens de células mamárias canina e humana. Para tanto, foram realizadas as técnicas de imunofluorescência indireta em tecido mamário hígido e neoplásico de cadelas e em linhagens de células mamárias canina e humana, além de avaliação através de microscopia confocal nestes materiais. Obteve-se diferentes padrões de marcação das Cxs 26, 32 e 43 e da Px1 em linhagens de células mamárias hígida e tumoral canina e humana. A expressão das Cxs 26, 32 e 43 e da Px1 nestas linhagens mostrou distribuição nuclear, citoplasmática e de membrana celular. Novos estudos são necessários para confirmar e ampliar os achados deste trabalho.

Palavras-chave: Canino. Esferóide celular. Linhagem celular. Neoplasia mamária. Panexina 1.

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXPRESSION OF
CONNECTIONS 26, 32, 43 AND PANEXIN-1 IN CANINE AND HUMAN
MAMMARY CELL LINE LINES**

ABSTRACT

Connexins, gap junction forming proteins, are strongly implicated in the maintenance of tissue homeostasis due to their important intercellular communication function. The panexins, hemicycsmal-forming proteins, were discovered within a little over a decade and have their role not well understood. It has been described changes in connexins during the carcinogenesis process and related panexin 1 to the oncogenic process. The decrease in the expression of the connexins or the deficiency in their capacity of intercellular communication is considered as the event most commonly associated with the neoplasias. In addition, inusual cytoplasmic localization of these proteins can occur in cancer cells. Connexins 26, 32 and 43 may be observed in mammary glands of rodents and humans, but during neoplastic processes the expression of these proteins may vary. Breast neoplasms are the second most frequent type of cancer in bitches and account for 50% of malignant cases. In this context, the objective was to identify the presence of panexin 1 in healthy and neoplastic breast tissue of bitches and to identify the presence of connexins 26, 32 and 43 and panexin 1 in canine and human mammary cell lines. Indirect immunofluorescence in healthy and neoplastic mammary tissue of bitches and in canine and human mammary cell lines were performed, as well as evaluation by confocal microscopy in these materials was done. Different marking patterns of Cxs 26, 32 and 43 and of Px1 were obtained in healthy and canine mammary and human breast cell lines. The expression of Cxs 26, 32 and 43 and Px1 in these lines showed nuclear, cytoplasmic and cell membrane distribution. Further studies are needed to confirm and amplify the findings of this work.

Keywords: Breast cancer. Canine. Cell lineage. Cell spheroid. Panexin 1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 26 e panexina1 na linhagem canina Miriah.	25
Figura 02: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem canina Brisa	27
Figura 03. Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem canina Leka.....	28
Figura 04. Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem canina CF41.....	29
Figura 05: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem humana MCF10a.....	30
Figura 06: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem humana MCF7.....	31
Figura 07. Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para panexina1 na linhagem canina CF41.....	32
Figura 08. Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexina 43 em esferoides celulares linhagem canina Miriah.....	33
Figura 09. Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexina 43 em esferoides celulares na linhagem canina Dara.....	34
Figura 10. Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexina 43 em esferoides celulares na linhagem canina CF41.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1	Características gerais dos tumores de mama caninos (TMC)	9
2.2	TMC como modelo de estudo de neoplasia mamária humana	11
2.3	Proteínas da família das junções gap: Conexinas	14
2.4	Proteínas formadoras de hemicanais: Panexinas	16
3	OBJETIVO GERAL	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Linhagens celulares de tecido mamário hígido canino e humano e proveniente de tumores mamários caninos e humanos	20
4.2	Agregados esféricos auto-organizados de colônias de células (esferoides celulares)	21
4.3	Ensaio de imunofluorescência nas linhagens de células mamárias canina e humana	21
4.4	Avaliação dos esferoides celulares por microscopia confocal	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
8	APÊNDICE	41
9	ANEXO	43

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento da Medicina Veterinária permitiu melhorias na qualidade de vida dos animais domésticos, em especial a dos animais de companhia, e isto se refletiu no aumento da expectativa de vida desta espécie. Com avanço da idade, os cães passaram a manifestar mais frequentemente doenças associadas ao envelhecimento, por exemplo, as neoplasias.

Neste contexto, as neoplasias mamárias são o segundo tipo de doença cancerígena mais comum em cães, afetam principalmente fêmeas de meia-idade e idosas e, aproximadamente, 50% dos casos são representados por tumores malignos (MISDORP, 2002). Além disso, assim como as mulheres, as fêmeas caninas apresentam ocorrência espontânea de câncer mamário e, portanto, são consideradas excelente modelo de estudo para compreender o câncer em humanos (ARLEY, 2012).

Diversas estruturas celulares têm sido estudadas com o objetivo de se obter melhor caracterização das neoplasias e auxiliar no diagnóstico, tratamento e profilaxia dos tumores de mama tanto em cães quanto em humanos. As pesquisas com proteínas formadoras de canais de membrana, como as conexinas e panexinas, tem sido alvo de estudos nas últimas décadas e são pesquisadas mais frequentemente em humanos (PENUELA *et al.*, 2014; JIANG; PENUELA, 2016).

A identificação das panexinas em células hípidas e neoplásicas caninas é o primeiro passo para caracterização destas proteínas que podem, no futuro, ser promissoras como alvo terapêutico. A utilização de linhagens celulares favorece a interpretação de dados na investigação científica, pois as condições controladas as quais estão submetidas as tornam um modelo biológico simplificado em comparação ao uso de animais de experimentação (VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007).

No presente estudo, foi realizada a técnica de imunofluorescência para identificação da panexina 1, proteína de membrana plasmática formadora de canal que permite a comunicação entre os meios intra e extracelular, e das conexinas 26, 32 e 43 em linhagens de células mamárias canina e humana hípidas e provenientes de tumores mamários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais dos tumores de mama canino (TMC)

As neoplasias mamárias são o tipo de neoplasia mais frequente em cadelas. Os TMC apresentam ocorrência espontânea e acometem principalmente animais de meia idade e idosos. Além disso, relata-se que quase metade dos casos de TMC é maligna (DALECK *et al.*, 1998; DE NARDI *et al.*, 2002; CASSALI *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011; FELICIANO *et al.*, 2012). As características histológicas dos TMC são bastante variáveis, pois a glândula mamária é constituída por células de origem epitelial e mesenquimal. Desta forma, as neoplasias podem ser de origem celular única ou mista (MISDORP *et al.*, 1999; MISDORP, 2002; CASSALI *et al.*, 2011).

A etiologia das neoplasias mamárias é tida como multifatorial, sendo que os aspectos genéticos e hormonais estão principalmente relacionados ao seu desenvolvimento (MISDORP, 2002; LANA *et al.*, 2007). Outros fatores que influenciam a ocorrência de TMC são sexo, idade, raça, ovariectomia (castração), obesidade e o uso de anticoncepcionais nas fêmeas caninas (DE NARDI, 2002; LANA *et al.*, 2007; SORENMO *et al.*, 2011; FELICIANO *et al.*, 2012).

Em relação aos aspectos clínicos, as formações tumorais mamárias variam de nódulos delimitados a massas de formato irregular, podem ser únicas ou múltiplas, estar presentes em uma ou mais glândulas, serem flutuantes ou aderidas à pele ou ao tecido muscular e apresentarem consistência macia ou firme. Os TMC podem ser ulcerados e/ou estarem associados a processo inflamatório. A avaliação histopatológica dos TMC é o padrão ouro para diagnóstico e está intimamente ligada ao prognóstico da neoplasia (DALECK *et al.*, 1998; MISDORP *et al.*, 1999; DE NARDI, 2002; CASSALI *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011).

Misdorp *et al.* (1999) propuseram uma classificação histológica dos TMC (Tabela 01) baseada em critérios histológicos e morfológicos descritivos, além de considerar fatores relacionados ao prognóstico dos TMC. Esta classificação é aceita pelos patologistas até os dias atuais. Os TMC são divididos em

benignos, malignos, tumores não classificados e hiperplasias ou displasias mamárias.

Tabela 01: Classificação Histológica de TMC. Modificada de: Misdorp *et al.* (1999).

Tumores Malignos	
Carcinoma não infiltrativo (<i>in situ</i>)	
Adenomioepitelioma maligno	
Carcinomas Simples	Carcinoma Tubulopapilar Carcinoma Sólido Carcinoma Anaplásico
Carcinomas de Tipos Especiais	Carcinoma Micropapilar Carcinoma de Células Escamosas Carcinoma Mucinoso Carcinoma Rico em Lipídeos Carcinoma secretório Carcinoma lobular invasivo Neoplasia mamária com diferenciação sebácea Carcinoma lobular pleomórfico
Sarcoma	Fibrossarcoma Osteossarcoma Outros Sarcomas (Condrossarcoma, Hemangiossarcoma, Lipossarcoma)
Carcinossarcoma	
Carcinoma ou Sarcoma em Tumores Benignos	
Tumores Benignos	
Adenoma	Adenoma Simples Adenomioepitelioma Adenoma Basalóide

Fibroadenoma	
Tumor Misto Benigno	
Papiloma Ductal	
Tumores não classificados	
Displasias/ Hiperplasias Mamárias	
Hiperplasia Ductal	
Hiperplasia Lobular	Hiperplasia Epitelial Adenose
Cistos	
Ectasia Ductal	
Fibrose Focal (Fibroesclerose)	
Ginecomastia	

O método de eleição para tratamento dos TMC é a remoção cirúrgica, exceto quando o diagnóstico é carcinoma inflamatório ou há quadro metastático associado à neoplasia. A exérese pode extirpar todo tecido tumoral e até promover a cura do animal ou mesmo a melhoria da qualidade e do tempo de sobrevivência do indivíduo (MISDORP, 2002; LANA *et al.*, 2007; CASSALI *et al.*, 2011; FELICIANO *et al.*, 2012).

Crítérios clínico-patológicos, tal como estadiamento do tumor, são os principais responsáveis pelo prognóstico de cadelas acometidas por TMC. No entanto, a complexa variabilidade clínica dos TMC tem aumentado o interesse em estudos e padronização de diversos marcadores celulares como possíveis fatores prognósticos independentes (CASSALI *et al.*, 2011; SORENMO *et al.*, 2011).

2.2 TMC como modelo de estudo de neoplasia mamária humana

As pesquisas em patologia comparada agregam benefícios tanto ao animal quanto ao homem, pois ampliam a compreensão de doenças em ambas as espécies. Os cães têm sido utilizados como modelo de estudos para várias enfermidades humanas e na investigação de desenvolvimento e eficácia de fármacos. Isto ocorre devido às similaridades genéticas, anatômicas, fisiológicas e patológicas entre estas duas espécies (KHANNA *et al.*, 2006; ARLEY, 2012).

Lindblad-toh *et al.* (2005) publicaram o sequenciamento do genoma canino e isto permitiu a identificação de muitas características genéticas compartilhadas entre o cão e o homem. Porém, mesmo anteriormente a esta descoberta, os cães já se apresentavam como modelo alternativo em pesquisas de terapias experimentais há muitas décadas (STORB *et al.*, 1967; TSOI *et al.*, 1974; BENJAMINI *et al.*, 1976; ROW *et al.*, 1977). Devido diversas doenças genéticas apresentarem semelhanças entre cães e humanos, a espécie canina é utilizada como modelo de estudo para tais patologias, inclusive para vários tipos de câncer (AIRLEY, 2012).

A ocorrência espontânea de neoplasia em cães é um dos grandes atrativos para o estudo comparado com humanos. Além disso, muitos tipos de neoplasias caninas apresentam características morfológicas análogas às encontradas em humanos, assim como o desenvolvimento tumoral também é influenciado por vários fatores envolvidos na carcinogênese humana, incluindo idade, nutrição, sexo, fase do ciclo reprodutivo e exposições ambientais. Melanomas, linfomas não-Hodgkin, leucemias, osteossarcomas, carcinomas mamários, carcinomas de cabeça e pescoço e de bexiga são alguns tipos de tumores que exibem interesse histopatológico comparativo (KHANNA *et al.*, 2006).

A necessidade de animais experimentais em ensaios pré-clínicos para estudos de neoplasias mamárias em humanos é um fator limitante neste tipo de pesquisa. Animais de laboratório, como camundongos transgênicos ou enxertados com linhagens celulares neoplásicas de origem humana, não mimetizam aspectos importantes das neoplasias em humanos, tais como heterogeneidade, microambiente tumoral e dependência de hormônios esteroidais para o crescimento (NANDI *et al.*, 1995; VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007). Concomitante a estas dificuldades é necessário lidar com o fato de haver distância genética entre as espécies, possível indução de alterações genéticas nos camundongos transgênicos e presença alterada de componentes do tecido adjacente normal, células estromais, vascularização e do sistema imunitário em enxertos neoplásicos (POLLARD, 1997; HOVEY *et al.*, 1999; BALKWILL *et al.*, 2005; GOSWAMI *et al.*, 2005; SCHWERTFEGER *et al.*, 2006; CHURCH *et al.*, 2009). Portanto, este tipo de modelo *in vivo* restringe extrapolar adequadamente estudos sobre patogênese, progressão e terapias

antineoplásicas para a espécie humana, bem como dificulta a identificação de biomarcadores moleculares confiáveis para prognóstico e o desenvolvimento de agentes terapêuticos efetivos (HANSEN; KHANNA, 2004; VARGO-GOGOLA; ROSEN, 2007).

Neste contexto, os cães apresentam características que permitem reproduzir aspectos essenciais do câncer de mama assim como ele ocorre em humanos. A diversidade de raças caninas que simulam a variabilidade genética observada em humanos, ocorrência espontânea de diferentes tipos neoplásicos, compartilhamento do ambiente com humanos e exposição a alguns dos mesmos carcinógenos, fatores de risco, tais como tratamento com progesterona, idade avançada, obesidade e dieta, além de menor longevidade dos cães favorecem os estudos de patologia oncológica comparada entre estas duas espécies (KNAPP; WATERS, 1997; LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005).

No que se refere à proximidade dos genomas, a sequência gênica dos cães está mais próxima a dos humanos do que a dos humanos em relação aos camundongos para muitas famílias gênicas, inclusive as associadas com a ocorrência de neoplasias (HOFFMAN; BIRNEY, 2007; CHURCH *et al.*, 2009). Estudos com carcinomas mamários revelaram que a expressão alterada dos genes do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (ERBB2) e do gene supressor tumoral p53 (TP53) eram similares no cão e no homem, sugerindo funções similares na carcinogênese e uso potencial como indicadores de prognóstico (RUNGSIPIPAT *et al.*, 1999; SETOGUCHI *et al.*, 2001; HAGA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002). Verificou-se também que mutações similares em oncogenes podem resultar em diferentes neoplasias em cães e humanos. Por exemplo, mutações em receptor de tirosina-quinase, receptor do fator de crescimento tirosina-quinase (KIT), foram identificadas em tumores gastrintestinais humanos e mastocitomas caninos (OZAKI *et al.*, 2002). Além disso, análises histológicas comparativas indicam que a heterogeneidade intratumoral observada em tumores mamários humanos também ocorre em tumores caninos (PORRELLO *et al.*, 2006). As consequências naturais desta heterogeneidade são alguns aspectos de prognóstico desfavorável em câncer, como resistência adquirida à terapia, recorrência e metástase.

2.3 Proteínas da família das junções gap: Conexinas

A organização estrutural de organismos multicelulares pode ser associada à capacidade cooperativa de suas células. Conjuntos de células especializadas desempenhando determinada função formam tecidos e é a interação das células de um tecido entre si e com a matriz extracelular que permite a manutenção da homeostase tecidual (MESE *et al.* 2007; VINKEN *et al.*, 2006). Neste contexto, as junções celulares comunicantes do tipo gap (JG) exercem o papel de comunicação metabólica e/ou elétrica (PFENNIGER *et al.*, 2011).

As JG são estruturas transmembranas formadas pela oligomerização hexamérica de subunidades protéicas, as conexinas (Cxs), as quais formam um hemicanal na membrana plasmática chamada conaxon. É o acoplamento de conexons presentes em células adjacentes que origina o canal intercelular (KAR *et al.*, 2012; KRUTOVSKIKH *et al.*, 1996). As Cxs estão amplamente presentes nas células dos tecidos de animais vertebrados e são filogeneticamente conservadas (BOND, NAUS, 2014; KRUTOVSKIKH *et al.*, 1996).

As JG são responsáveis pelo fluxo entre o citoplasma de células adjacentes de moléculas pequenas e hidrofílicas (menores que 1000 daltons), tais como metabólitos, nutrientes e segundos mensageiros, através de difusão passiva, e este evento é chamado de comunicação intercelular pelas junções gap (CIJG) (ALEXANDER, GOLDBERG, 2003).

Os genes que codificam para as proteínas Cxs fazem parte de uma família multigênica constituída por 20 membros nos roedores e 21 membros no genoma humano. Devido à variação da expressão destes genes em órgãos e tecidos, é comum a presença de mais de uma isoforma, de Cx em diferentes tipos celulares (KAR *et al.*, 2012; PFENNIGER *et al.*, 2011; YAMASAKI, NAUS, 1996). A nomenclatura das Cxs baseada no peso molecular da proteína, em daltons, permite a classificação destas por números (Cx26 representa a proteína com peso molecular 26 kDa, Cx43 representa a proteína com peso molecular 43 kDa, etc). (SOHL, WILLECKE, 2004; YAMASAKI, NAUS, 1996).

Na década de 1990, diversos pesquisadores associaram alterações das JG em diferentes tecidos de várias espécies a processos neoplásicos (KRUTOVSKIKH *et al.*, 1995; TROSKO *et al.*, 1990; YAMASAKI, 1990; YAMASAKI, NAUS, 1996). Tal informação é coerente com o fato das conexinas

apresentarem estreita relação com os processos de desenvolvimento, diferenciação e na regulação do crescimento celular. Desta forma, alterações nestas proteínas conduzem a um desequilíbrio da homeostase celular característico da carcinogênese (EVANS, MARTIN, 2002; MESE *et al.*, 2007; MESNIL *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2004; YAMASAKI, NAUS, 1996).

Estudos demonstram que genes que codificam para as conexinas podem atuar como genes supressores de tumores, assim como os conhecidos genes Rb e p53, responsáveis pela regulação da proliferação celular. Desta forma, mutações ou deleções nestes genes podem conduzir a produção de proteínas defeituosas ou a sua não produção, inviabilizando a importante tarefa da CIJG (ALEXANDER, GOLDBERG, 2003; MESNIL, 2002; YAMASAKI, NAUS, 1996). Porém, outros mecanismos relacionados direta ou indiretamente a distúrbios na expressão das conexinas podem estar envolvidos e contribuir para ocorrência do processo neoplásico, tal como a localização atípica de conexinas no citoplasma de células cancerosas como consequência de mutações específicas observadas em experimentos *in vitro* (MESNIL *et al.*, 2005).

Em uma pesquisa sobre a expressão de conexinas em glândulas mamárias de camundongos, ratos e humanos, foi observada a presença da Cx43 nas células mamárias das três espécies, enquanto as Cx32 e Cx26 só estavam expressas nas glândulas mamárias dos roedores durante o período de lactação. A imunohistoquímica revelou que a expressão das três conexinas apresentava localização restrita entre os diversos tipos celulares mamários e que a presença das mesmas dependia da atividade fisiológica da glândula. As células mioepiteliais apresentavam a Cx43, enquanto as Cx32 e Cx26 foram localizadas na fronteira basolateral de células secretoras alveolares apenas dos roedores (Pozzi *et al.*, 1995).

A redução da expressão de conexinas e a deficiência da capacidade funcional das JG em vários tipos de linhagens tumorais e neoplasias têm sido relacionadas ao aumento de susceptibilidade à transformação celular e à carcinogênese (KAR *et al.*, 2012; MESNIL *et al.*, 2005). Ainda assim, é descrito a ocorrência de superexpressão destas proteínas em displasias ou estágios iniciais da oncogênese (TELEKI *et al.*, 2014).

Uma revisão aponta que em câncer de mama humano as conexinas atuam como agente supressor no tumor primário, porém em tumores avançados,

estas proteínas têm um papel dependente do contexto, pois podem atuar tanto como supressores quanto facilitadores da progressão neoplásica (McLachlan *et al.*, 2007). Torres *et al.* (2005), em um estudo sobre o padrão de imunomarcagem das Cx26 e Cx43 em tecido hígido e neoplásico de glândulas mamárias caninas, observaram a redução destas proteínas ou aumento da sua imunomarcagem citoplasmática em neoplasias malignas. Porém, não foram observadas diferenças entre a imunomarcagem no tecido mamário hígido, tecido mamário hiperplásico e tumores mamários benignos. Portanto, estudos sobre a expressão das JG na espécie canina, em especial nas glândulas mamárias, podem conduzir a uma melhor caracterização das neoplasias deste tecido e auxiliar no diagnóstico, tratamento e profilaxia de tumores de mama em cães.

2.4 Proteínas formadoras de hemicanais: Panexinas

Descobertas há quase duas décadas, as panexinas (Pxs) são proteínas transmembranas formadoras de hemicanais (HC) (PANCHIN *et al.*, 2000). Devido a sua homologia com as inexas (família das junções gap dos invertebrados) foi inicialmente considerada uma nova família das junções gap em vertebrados. No entanto, estudos têm demonstrado que as panexinas formam canais únicos de membrana, exercendo o papel de comunicação metabólica e/ou elétrica entre os meios intracelular e extracelular (PENUELA *et al.*, 2012).

Em relação aos genes das panexinas, estes são agrupados em três isotipos e seus produtos são chamados de Px1, Px2 e Px3 (BARANOVA *et al.*, 2004). Estas proteínas são estruturas transmembranas formadas pela oligomerização hexamérica de subunidades protéicas, as panexinas (Pxs), as quais formam um hemicanal na membrana plasmática chamado panexon (BOND, NAUS, 2014). A figura 1 representa estruturalmente as Pxs. Elas apresentam quatro domínios transmembranas, dois loops extracelulares, um loop intracelular, uma terminação amino (NH₂) e uma terminação carboxi (COOH). As Pxs apresentam sítios de N-glicosilação no loop extracelular em diferentes posições (Px1 em N254, Px2 em N86 e Px3 em N71) (PENUELA *et al.*, 2012).

Os HC têm a função de realizar eventos celulares específicos, tais como a difusão de íons e pequenos metabólitos entre o meio intracelular e o extracelular e promover sinalização autócrina e parácrina (PFENNIGER *et al.*, 2011, VINKEN *et al.*, 2006). As Pxs exibem diversos perfis subcelulares que indicam que podem desempenhar papéis distintos em células e tecidos de diferentes origens (PENUELA; LAIRD, 2012). Px1 realiza a mediação da liberação de ATP (nucleotídeo adenosina trifosfato), tem importante papel na propagação de ondas de cálcio através da interação com receptores purinérgicos, via Px1 a liberação de ATP e UTP (nucleotídeo uridina trifosfato) atua como sinal “find-me” para depuração de células apoptóticas entre outras atividades fisiológicas. Px2 mostra estar envolvida com a diferenciação de neurônios e a atividade de seus canais podem contribuir para danos isquêmicos no cérebro. Px3 expressa-se principalmente nos queratinócitos, condrócitos e osteoblastos regulando a proliferação e diferenciação celular. À Px3 também tem sido atribuído o papel de condução de ATP (PENUELA; LAIRD, 2012; JIANG; PENUELA, 2016).

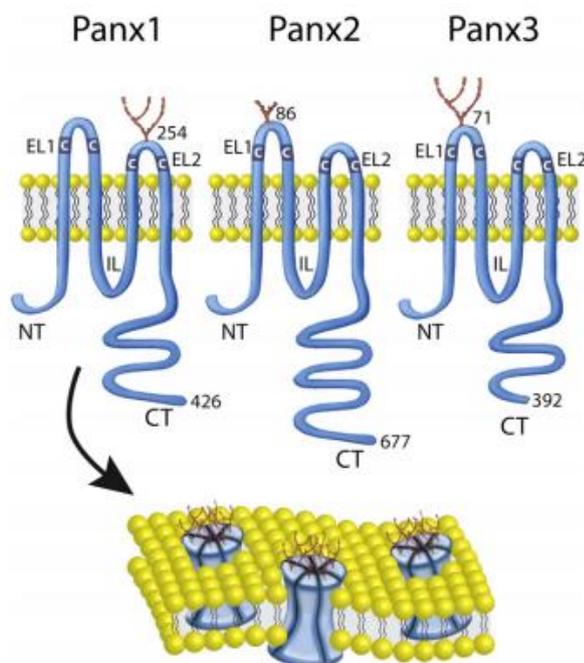


Figura 1: Representação esquemática dos três membros da família Pxs. Px1, Px2 e Px3 têm diferentes comprimentos de aminoácidos e são todas integrantes de proteínas de membrana com locais de N-glicosilação no aminoácido 254 (Px1), 86 (Px2, previsto) e 71 (Px3). Todos as Pxs têm dois resíduos de cisteína

em cada ciclo extracelular (C). EL1, EL2 (laços extracelulares 1 e 2), IL (circuito intracelular), CT (carboxi-terminal) e NT (amino-terminal).

Em um artigo de revisão, Jiang; Penuela (2016) descrevem que muitas enfermidades estão associadas as Pxs, em especial à Px1. Esta informação é coerente com o fato das Pxs estarem amplamente presentes nas células dos tecidos de animais vertebrados, apresentarem importante papel no desenvolvimento de diversos tecidos e tipos celulares, poderem estar envolvidas no processo de proliferação celular, diferenciação e inflamação.

Análises de bancos de dados indicam uma ligação positiva entre genes que codificam para a proteína Px1 e a ocorrência de diversos tipos de câncer (BOND, NAUS, 2014; KAR *et al.*, 2012).

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença das conexinas 26, 32, 43 e panexina-1 em linhagens de células mamárias canina e humana híbridas e provenientes de tumores mamários e em agregados esféricos auto-organizados de colônias de células (esferoides celulares) obtidos a partir de linhagens celulares caninas e humanas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de tecido mamário hígido e neoplásico de fêmeas caninas foram obtidas na unidade Parada Inglesa do Hospital Veterinário Público (ANCLIVEPA) de São Paulo/SP. A análise histopatológica foi realizada no Laboratório de Patologia Veterinária SEMEVE (Histopathus) em Salvador/BA. As linhagens primárias de TMC foram desenvolvidas no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparadas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/SP.

As análises dos materiais pela técnica imunofluorescência (IF) foram realizadas no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparadas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/SP e as avaliações através de microscopia confocal foram realizadas no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da Universidade de São Paulo/SP.

4.1 Linhagens celulares de tecido mamário hígido canino e humano e proveniente de tumores mamários caninos e humanos

Foram utilizadas quatro diferentes linhagens de tecido mamário canino e três linhagens de tecido mamário humano nos experimentos. As linhagens Miriah (tecido epitelial mamário hígido canino), Brisa (tecido mioepitelial tumoral mamário canino), Leka (tecido mioepitelial tumoral mamário canino – Carcinoma Complexo) e Dara (tecido mioepitelial tumoral mamário canino – Carcinoma Misto) foram desenvolvidas no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo/SP. A linhagem mamária metastática CF41 é uma linhagem canina comercial. As linhagens mamárias humanas MCF10 (tecido epitelial mamário hígido), MCF7 (tecido epitelial mamário tumoral - Adenocarcinoma) e MDAMB231 (tecido mioepitelial mamário tumoral – Carcinoma Ductal Invasivo) são todas linhagens comerciais (ATCC, Manassas, VA, USA).

A linhagem celular MCF10A foi mantida em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium)/F12 (Hyclone) suplementado com soro de cavalo (Gibco), 10ng/mL de EGF, toxina colérica 10UI/mL, 5ug/mL insulina, e 1ug/mL de hidrocortisona. As células MCF7 foram mantidas em DMEM (Dulbecco's

modified Eagle's médium) (Hyclone) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) (Gibco). As células mamárias caninas CF41 foram mantidas em DMEM (Hyclone) suplementado com 10% FBS (Gibco). As linhagens de células mamárias caninas primárias (Miriah, Leka, Brisa e Dara) foram mantidas em meio Advanced suplementado com 10% FBS (Gibco) 10 ng/mL de EGF, toxina colérica 10UI/mL, 5ug/mL insulina, e 1ug/mL de hidrocortisona. Todos os meios foram suplementados com 2mM de glutamina (Thermo Scientific) e penicilina/estreptomicina (Pen/Strep, Thermo Scientific). Os cultivos celulares foram mantidos em estufa de CO₂ com atmosfera umidificada e 5% de CO₂ a 37°C.

4.2 Agregados esféricos auto-organizados de colônias de células (esferoides celulares)

A obtenção de esferoides celulares foi realizada a partir das linhagens caninas primárias Miriah e Dara (tecido mioepitelial tumoral mamário canino – Carcinoma Misto) e da linhagem canina comercial CF41. As suspensões celulares de cada linhagem foram a uma densidade de 40.000 células por Mililitro nos respectivos meios acrescidos ou não de fatores de crescimento, foram acondicionados em placas de seis poços de baixa adesão (2,5 mL por Placa). O meio de cultivo foi trocado a cada quatro dias. As células foram cultivadas durante 15 dias para formação e crescimento dos esferoides celulares. Por inspeção visual utilizando um microscópio equipado com uma retícula, foi possível observar que os esferoides celulares já apresentavam o diâmetro de 30 a 50 µm em uma ampliação de 400x com objetiva. Os esferoides foram lavados com PBS 1x e fixados com álcool 70% por 20 minutos a -20°C. Foi realizada a inclusão celular em HistoGel. O gel contendo os esferoides celulares foi processado e emblocado em parafina.

4.3 Ensaio de imunofluorescência nas linhagens de células mamárias canina e humana

Primeiro, efetuou-se o preparo das células na placa de 6 poços, colocando-se lamínulas de 22 x 22 mm em cada poço, irradiando por 15 minutos na luz ultravioleta. Depois de esterilizar as lamínulas as células de interesse foram colocadas nas placas com seu respectivo meio de cultivo e observou-se a

confluência das células. Quando já estavam confluentes, retirou-se o meio de cultivo e os poços foram lavados com 2 mL de PBS 1x estéril. Descartou-se o PBS e foi acrescentado 2 mL de etanol 70% e as placas foram incubadas a -20°C por 10 minutos. Passado este tempo, descartou-se o etanol 70% e foi colocado novamente o PBS 1x estéril. Estas células fixadas ficaram armazenadas na geladeira com um volume de 2 mL de PBS 1x até o dia da realização do ensaio de imunofluorescência.

As células foram submetidas ao tampão de recuperação antigênica EDTA pH 9,0 aquecido por 20 minutos. Após as lavagens, o bloqueio antigênico das lâminas foi realizado em PBS com 5% de leite, 0,1% Triton X-100, durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas em câmara úmida, overnight a 4°C, com os anticorpos apresentados no quadro 1. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Triton X-100 e incubadas com os anticorpos secundários marcados ou com Alexa flúor 488 (FITC - Dako, Carpinteria, CA, USA, 1:100) durante 60 minutos, em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS contendo 0,1% Triton X-100 e montadas com Vectashield com DAPI, para evitar o esgotamento da fluorescência (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA) e vedadas com esmalte.

Quadro 1: Descrição dos anticorpos utilizados no ensaio de IF.

ANTICORPO	EMPRESA	CÓDIGO	ORIGEM	TIPO DE ANTICORPO	DILUIÇÃO
Conexina 26	Zymed	71-0500	Coelho	Policlonal	1:100
Conexina 32	Invitrogen	13-8200	Camundongo	Monoclonal	1:100
Conexina 43	Zymed	71-0700	Coelho	Policlonal	1:100
Panexina 1	AbCam	ab139715	Coelho	Policlonal	1:50
Panexina 1	Novus Biologicals	NBP192241	Coelho	Policlonal	1:50
Panexina 1	ThermoFisher	PA534475	Coelho	Policlonal	1:50
Panexina 1	Santa Cruz	Sc49695	Cabra	Policlonal	1:50

4.4 Avaliação dos esferoides celulares por microscopia confocal

As lâminas com cortes histológicos dos esferoides submetidos à IF foram analisadas com microscópio Confocal Zeiss LSM 780-NLO.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

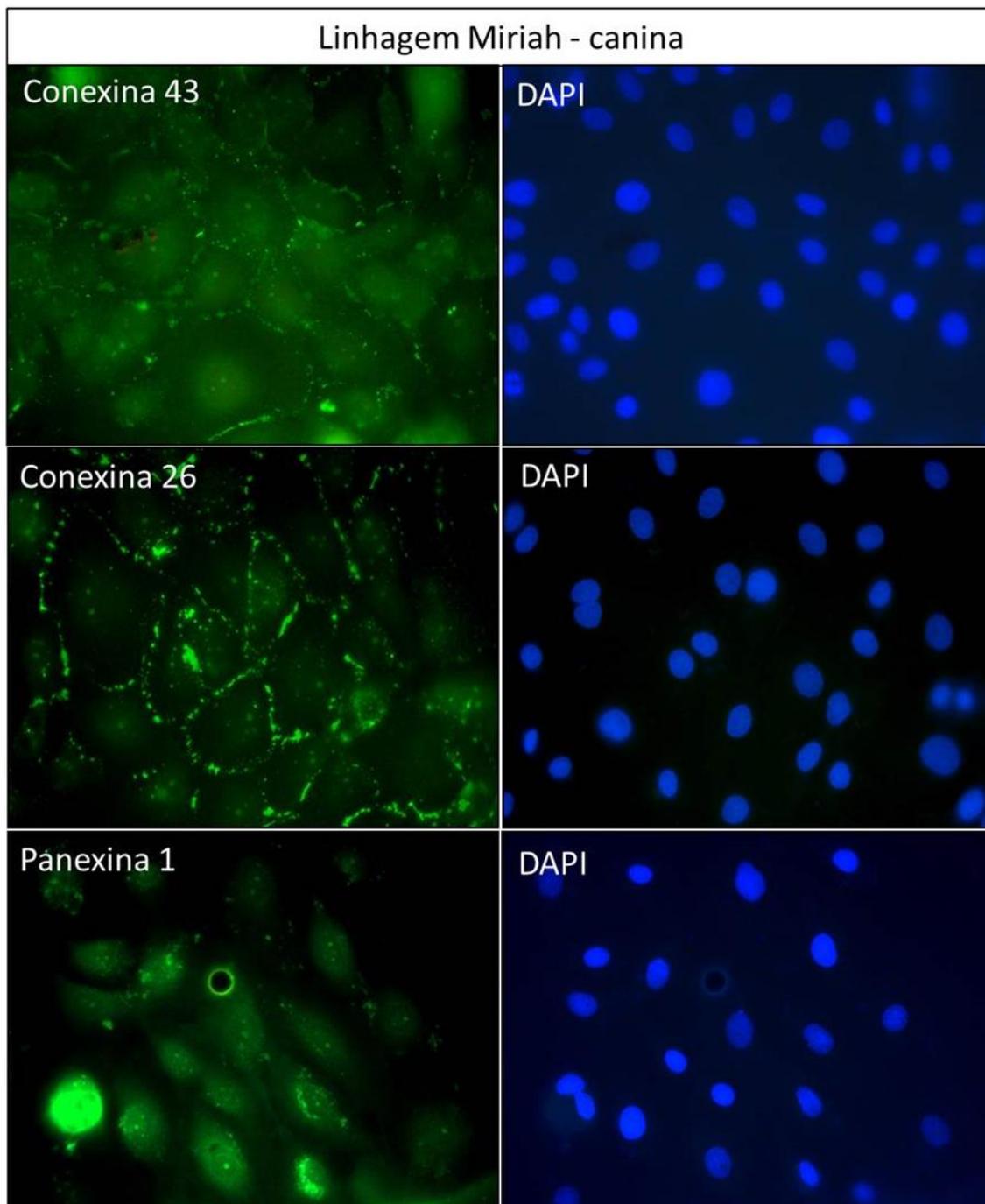
Ensaio de IF nas linhagens de células mamárias canina e humana

As figuras 1 a 4 ilustram o ensaio de IF em linhagens de células mamárias canina hígida e tumoral e as figuras 5 a 7 das linhagens mamárias humana hígida e tumoral. A expressão das Cxs 26, 32 e 43 e da Px1 nestas linhagens mostrou distribuição nuclear, citoplasmática e de membrana celular.

Os resultados obtidos neste estudo pela técnica de imunofluorescência mostram que as Cxs 26, 32 e 43, conhecidas por formar hemicanais transmembrana e junções gap, podem diretamente interagir com proteínas reguladoras dentro das células e, portanto, apresentar tanto localização em membrana celular quanto citoplasmática (LAIRD, 2010). Também é descrito que células tumorais frequentemente apresentam expressão atípica das Cxs, principalmente expressão citoplasmática (SCHALPER *et al.*, 2014).

Em relação a Px1, são poucos os estudos focados no âmbito dos animais domésticos e o conhecimento sobre a função das Pxs para ocorrência das neoplasias é limitado (JIANG; PENUELA, 2016). Além disso, por vezes, a localização visual de hemicanais tem sido realizada utilizando-se anticorpos não completamente validados quanto a sua especificidade, titulação, reprodutibilidade e estabilidade (SCHALPER *et al.*, 2014). Neste contexto, apesar dos resultados aqui apresentados serem descritivos, ainda assim, aumentam o leque de informações sobre a Px1.

Figura 1: Ensaio de IF em linhagem de células mamárias canina hígida.



Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b), d) e f) Núcleo celular marcado com DAPI; c) Conexina 26 marcada com Alexa Fluor 488; e) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488 (Objetiva 40x).

Observou-se que a linhagem de células mamárias hígidas (Figura 1), linhagem Miriah, apresentou marcação para as conexinas 26 e 43. O tecido epitelial foi fortemente positivo para conexina 26 e a marcação estritamente localizada na membrana celular. A marcação para conexina 43 foi menos intensa e manteve-se restrita a membrana celular. Não foi observado marcação para

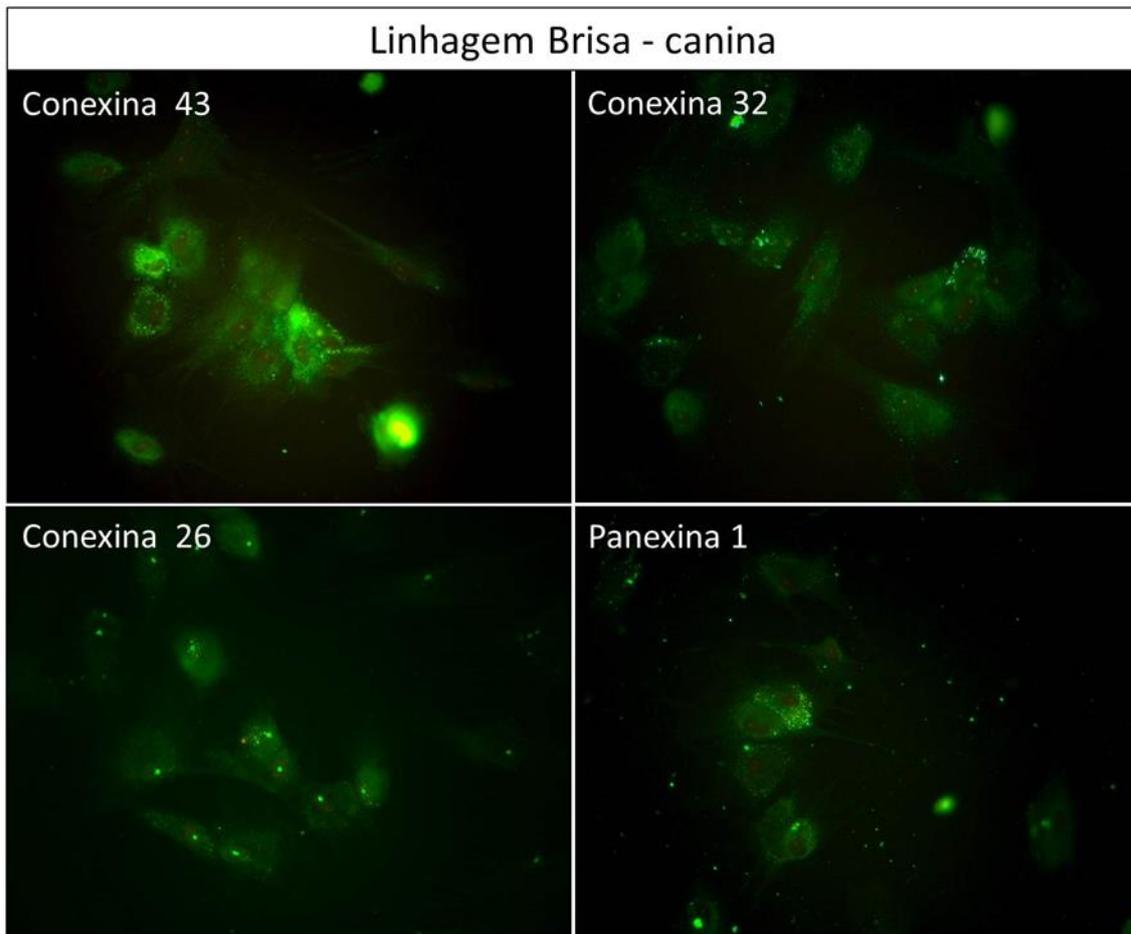
conexina 32. Este resultado está de acordo com o descrito na literatura para tecido mamário canino (TORRES *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre a expressão de conexinas em mama humana está restrito ao tecido de mulheres adultas não-grávidas, pois há dificuldades em se obter amostras para estudos das fases de puberdade, gravidez e lactação. Como observado neste estudo da linhagem de células mamárias híginas canina (Miriah), apenas a expressão das conexinas 26 e 43 havia sido relatada em tecido de glândula mamária humana até 2014 (STEWART; SIMEK; LAIRD, 2015). No entanto, Teleki *et al.* (2014) identificaram as conexinas 30, 32 e 46 em estudo de correlação da expressão de conexinas com a progressão de tumor e o prognóstico no câncer de mama primário em humanos.

O conjunto destas informações permite inferir que o uso do cão como modelo de estudo nesta área é de grande valia, pois uma melhor compreensão do papel das conexinas em glândula mamária canina pode ter implicações que desdobrem a uma perspectiva mais ampla do entendimento das conexinas na saúde humana, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de terapias efetivas.

A marcação para panexina 1 demonstrou fluorescência limitada ao interior das células na linhagem de células mamárias híginas (Figura 1). Em células híginas esperava-se que a proteína Px1 apresenta-se distribuição em membrana celular, pois é uma estrutura que forma hemicanais que permitem a comunicação do meio intracelular com o extracelular (PENUELA *et al.*, 2012). No entanto, é descrito que após atingir a superfície celular, a Px1 pode apresentar um estado altamente instável/móvel enquanto presente na membrana plasmática (Bhalla-Gehi *et al.*, 2010).

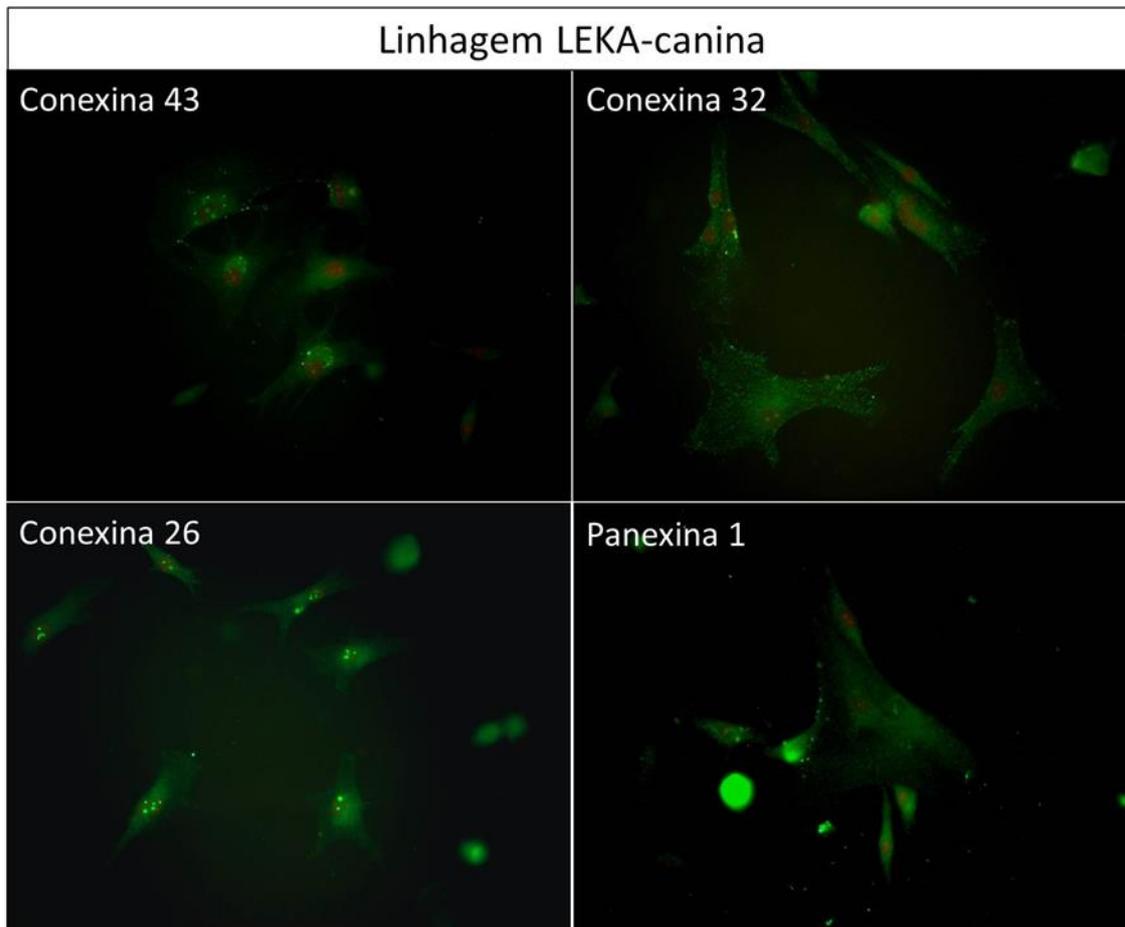
Figura 2: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem Brisa.



Legenda: a) Connexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Connexina 32 marcada com Alexa Fluor 488; c) Connexina 26 marcada com Alexa Fluor 488; d) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488 (Objetiva 20x).

A figura 2, linhagem tumoral mioepitelial Brisa, apresentou marcação para os três tipos de conexinas estudadas. No entanto, estas marcações variaram em intensidade e localização, corroborando dados de literatura (JAMIESON *et al.*, 1998). A marcação da conexina 43 foi mais intensa do que as demais e apresentou localização citoplasmática e de membrana, enquanto a marcação da conexina 32 foi restrita ao citoplasma e a da conexina 26 à região nuclear. Panexina 1 apresentou marcação citoplasmática e de membrana celular.

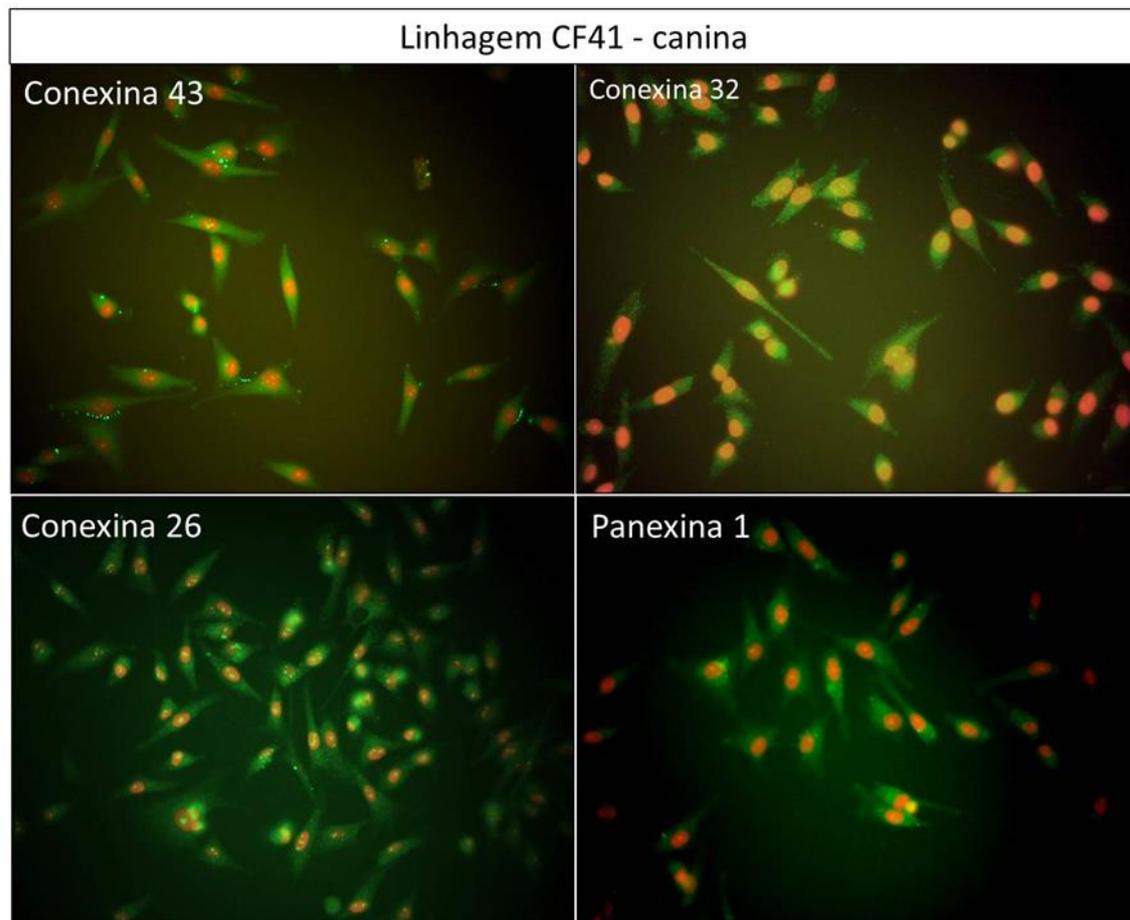
Figura 3: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem Leka.



Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Conexina 32 marcada com Alexa Fluor 488; c) Conexina 26 marcada com Alexa Fluor 488; d) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488 (Objetiva 20x).

A linhagem tumoral mioepitelial Leka (Figura 3) apresentou distribuição nuclear da Cx26 e foram observadas as conexinas 32 e 43 dispersas no citoplasma. A panexina1 formou poucas e pontuais marcações no citoplasma e membrana celular.

Figura 4: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem CF41.



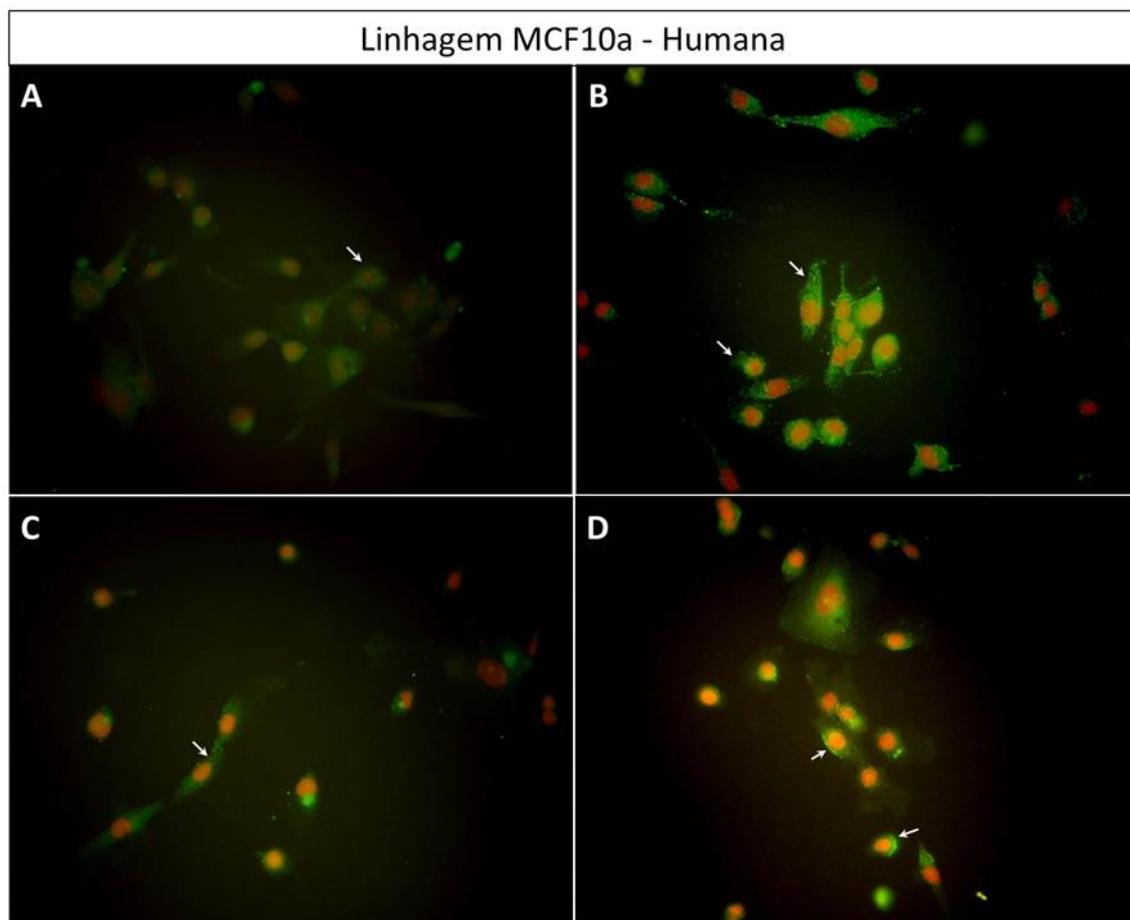
Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Conexina 32 marcada com Alexa Fluor 488; c) Conexina 26 marcada com Alexa Fluor 488; d) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488 (Objetiva 20x).

Apesar de pouca confluência celular da linhagem metastática tumoral CF41 (Figura 4), foi possível observar a marcação intercelular da conexina 43. A conexina 26 apresentou-se fortemente marcada na região nuclear, enquanto a marcação para conexina 32 foi principalmente citoplasmática e panexina 1 apresentou sutil marcação em membrana celular.

As linhagens tumorais caninas (Brisa, Leka e CF41) apresentaram padrão de expressão das conexinas estudadas atípico (marcações citoplasmática e nuclear) comparando-as com a linhagem mamária hígida (Miriah). Via de regra, as marcações nas linhagens tumorais foram menos intensas confirmando que independentemente da espécie e do tipo de neoplasia a falta de comunicação celular é um aspecto fenotípico comum as células cancerosas (MESNIL, 2002).

Por outro lado, a expressão da Px1 nas linhagens tumorais canina não permitem realizar nenhuma inferência, pois nem a marcação das células mamárias hígdas apresentou o padrão de membrana celular como esperado. Sugere-se que a expressão da Px1 seja necessária nos estágios iniciais do desenvolvimento de células e tecidos e que após este período deva ter sua expressão reduzida para evitar efeitos deletérios em processos patológicos, tais como o câncer (JIANG; PENUELA, 2016).

Figura 5: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem MCF10a.

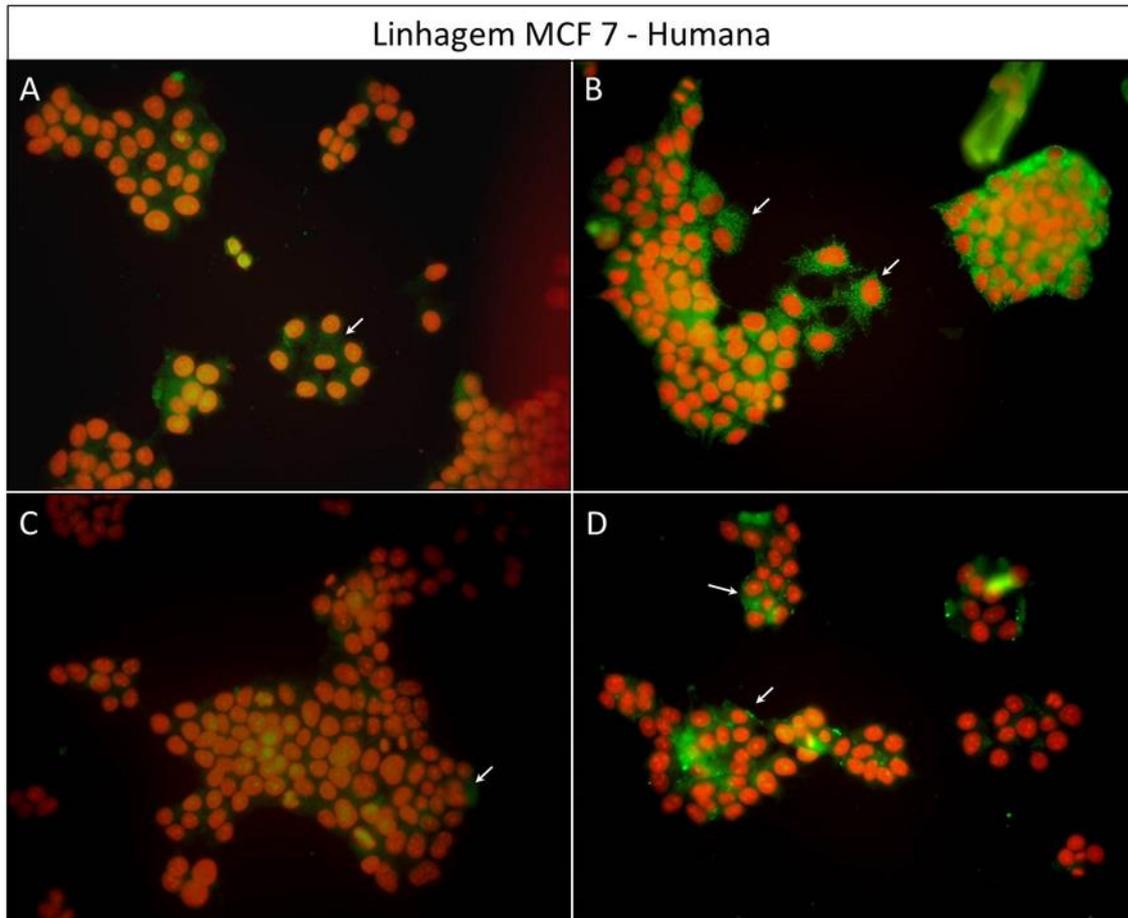


Legenda: a) Conexina 43 não marcada por Alexa Fluor 488; b) Conexina 32 marcada com Alexa Fluor 488; c) Conexina 26 marcada com Alexa Fluor 488; d) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488 (Objetiva 20x).

Não foi observado marcação da conexina 43 na linhagem de células mamárias hígdas humanas (Figura 5), assim como esperado, já que esta linhagem é negativa para este marcador. A conexina 32 apresentou forte

marcação citoplasmática, enquanto tanto a marcação para conexina 26 quanto panexina 1 demonstrou marcação em citoplasma e em membrana celular.

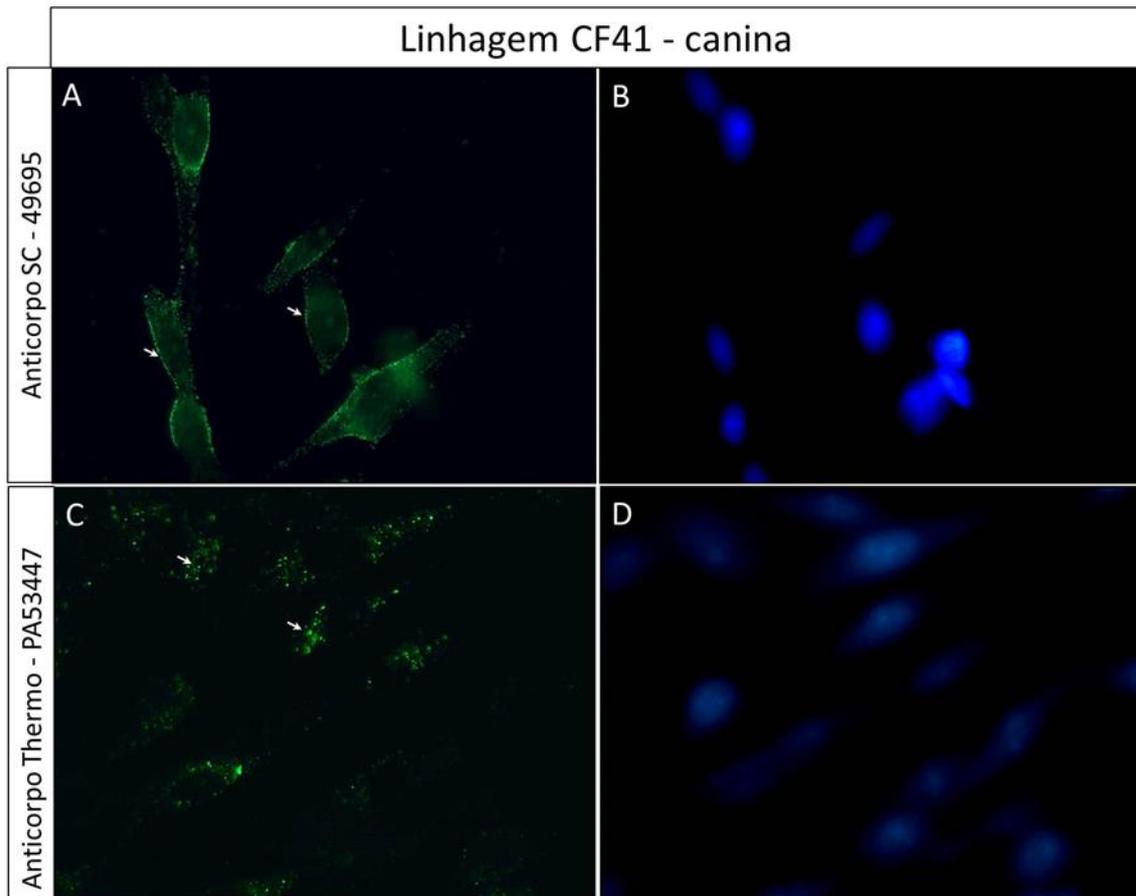
Figura 6: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexinas 43, 32, 26 e panexina1 na linhagem MCF7.



Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Conexina 32 marcada com Alexa Fluor 488; c) Conexina 26 marcada com Alexa Fluor 488; d) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488 (Objetiva 20x).

A linhagem epitelial tumoral MCF7 (Figura 6) apresentou marcação discreta para conexina 43 e conexina 26. Porém a marcação para conexina 32 apresenta-se bastante intensa em citoplasma e para panexina1 mostra-se principalmente em membrana celular.

Figura 7: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para panexina1 na linhagem CF41.



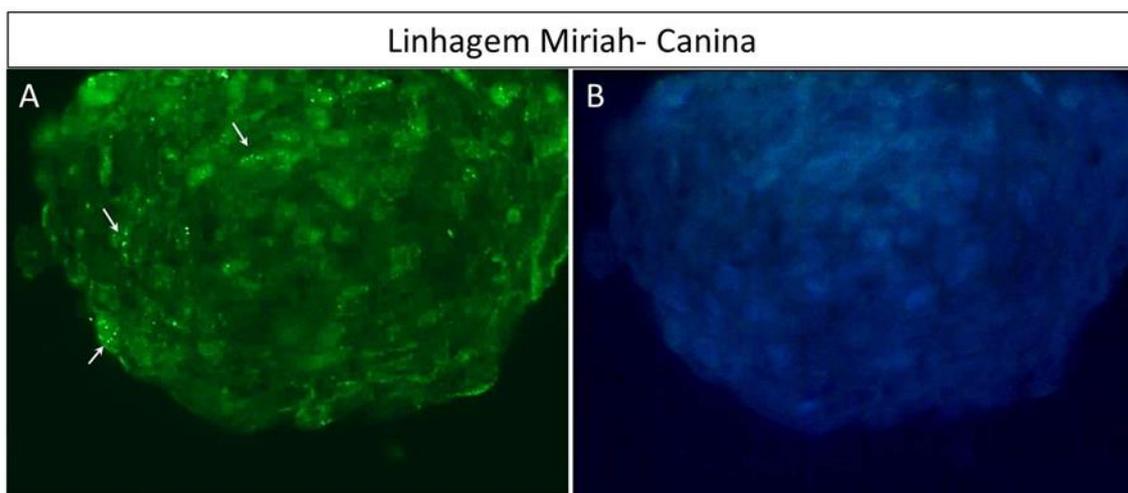
Legenda: a) e c) Panexina1 marcada com Alexa Fluor 488; b) e d) Núcleo celular marcado com DAPI (Objetiva 20x).

O ensaio de imunofluorescência com anticorpo panexina1 de quatro diferentes fabricantes (AbCam, Novus Biologicals, ThermoFisher e Santa Cruz) realizado nas linhagens de células mamárias canina e humana apresentou marcação apenas para duas marcas, ThermoFisher e Santa Cruz (Figura 7). Observa-se que a marcação na linhagem CF41 mostrou-se diferente de acordo com o fabricante do anticorpo, sendo que para a panexina 1 da Santa Cruz a marcação foi em membrana celular, enquanto para a panexina1 da ThermoFisher a marcação foi citoplasmática. Portanto, a validação da especificidade do anticorpo utilizado é de suma importância quando há o propósito de esclarecer os diversos perfis de localização das Pxs (PENUELA; LAIRD, 2012).

Avaliação dos esferoides celulares por microscopia confocal

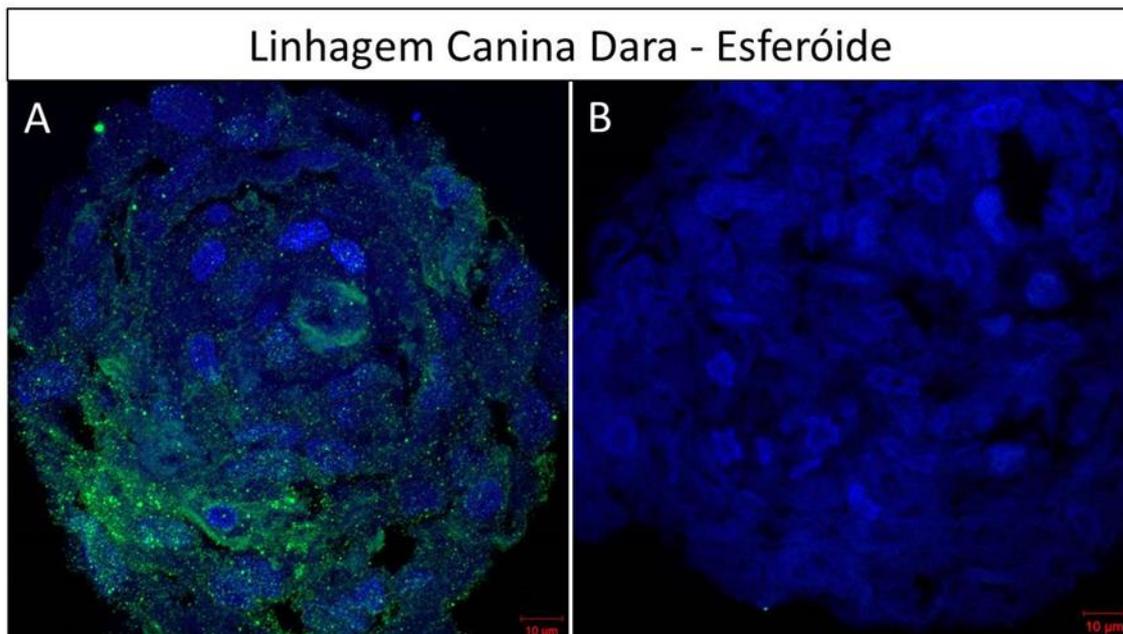
A utilização do microscópio confocal permitiu a confirmação dos dados obtidos na microscopia de imunofluorescência para a marcação de conexina 43 nas linhagens Miriah e CF41. A figura 8 mostra a formação de placas de conexão entre as células do esferoide, assim como a figura 1 apresenta as ligações gap entre as células em monocamada da linhagem Miriah. O mesmo padrão observado nos esferoides na linhagem CF41 foi visto nas células em monocamadas, respectivamente, figuras 4 e 10. Na linhagem Dara (Figura 9) observou-se distribuição marcante da conexina 43 em região citoplasmática, porém também há presença em região nuclear e de membrana celular.

Figura 8: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexina 43 em esferoides celulares linhagem Miriah.



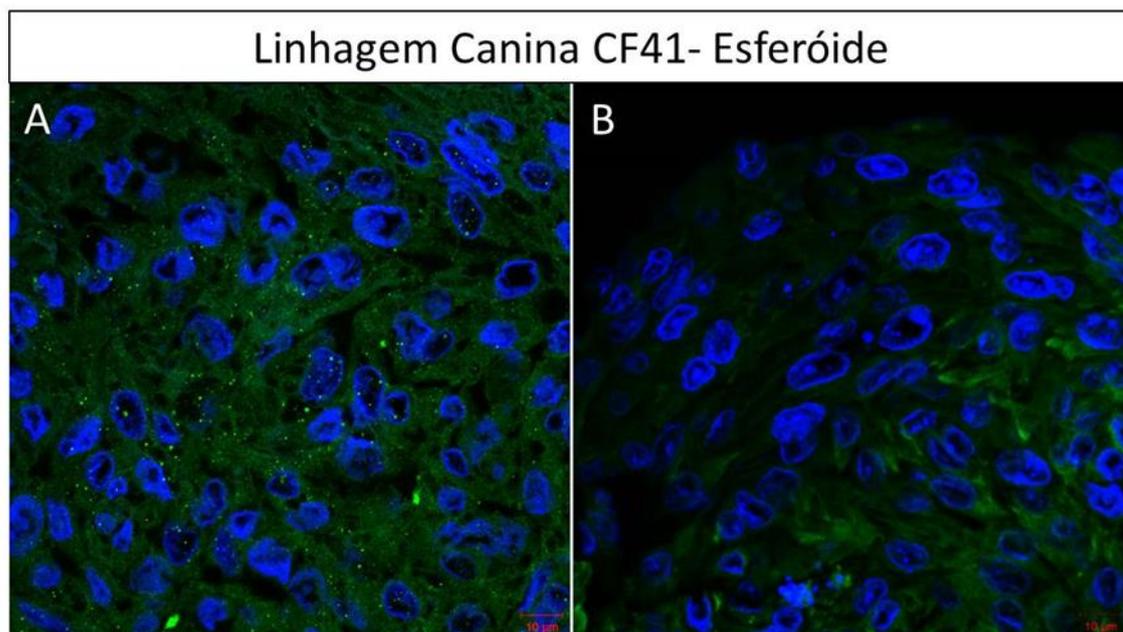
Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Núcleo celular marcado com DAPI (Objetiva 40x).

Figura 9: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexina 43 em esferóides celulares na linhagem Dara.



Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Núcleo celular marcado com DAPI – Controle negativo (Objetiva 63x).

Figura 10: Figura 9: Fotomicrografia representativa de marcação por imunofluorescência para conexina 43 em esferóides celulares na linhagem CF41.



Legenda: a) Conexina 43 marcada com Alexa Fluor 488; b) Núcleo celular marcado com DAPI – Controle negativo (Objetiva 63x).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados sobre as conexinas 26, 32 e 43 e panexina 1 foram escassos em virtude das dificuldades técnicas encontradas durante a execução do trabalho. No entanto, até o presente momento os estudos envolvendo panexina1 refere-se basicamente a humanos e animais de laboratório, pois a descoberta desta proteína ocorreu a menos de duas décadas e, geralmente, estas espécies são as primeiras a serem estudadas e terem protocolos/ metodologias desenvolvidas especificamente para seus estudos.

Mesmo que os dados apresentados sejam escassos, a padronização da metodologia para estudo de panexina 1 em células mamárias caninas e a sua identificação em tecido mamário canino foi apresentada pela primeira vez. Dados inéditos como esse abrem precedentes para perspectivas futuras. Portanto, é possível, inferir que, os estudos de canais de comunicação, conexinas e panexina1, em células tumorais de cães conduzam à melhor caracterização das neoplasias e auxiliem no diagnóstico, tratamento e prognóstico dos tumores de mama tanto em cães quanto em humanos. No Brasil, esta linha de pesquisa é ainda pouco explorada, de tal modo que trabalhos de padronização de metodologias devam ser realizados para que sirvam de base para futuros avanços nos estudos dessas proteínas em neoplasia mamária em cães.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER D. B., GOLDBERG G. S. Transfer of biologically important molecules between cells through gap junction channels. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.19, p.2045-2058, 2003.

ARLEY, R.: Lab Reports and Cat Scans: can veterinary oncology guide our way to new treatments for human cancers? **Future Med. Chem.**, v. 4(11), p. 1391-1394, 2012.

BALKWILL F. *et al.*: Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, v.7, p.211-217, 2005.

BARANOVA A. *et al.*: The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. **Genomics**, v.83, p.706-716, 2004.

BENJAMINI, E. *et al.*: Tumor Vaccines for Immunotherapy of Canine Lymphosarcoma. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.277, p.305-312, 1976.

BHALLA-GEHI R. *et al.*: Pannexin1 and pannexin3 delivery, cell surface dynamics and cytoskeletal interactions. **J. Biol. Chem.**, v.285, p.9147-9160, 2010.

BOND S. R., NAUS C. C. The pannexin: past and present. **Frontiers Physiology**, 5, 58. <http://doi.org/10.3389/fphys.2014.00058> , 2014.

CASSALI *et al.*: Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors, **BJVP**, v. 4(2), p. 153-180, 2011.

CHURCH D.M. *et al.*: Lineage-Specific Biology Revealed by a Finished Genome Assembly of the Mouse. **PLOS Biology**, 7(5). e1000112. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000112>, 2009.

DALECK *et al.* Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Ciência Rural*. v.28, n.1, p.95-100, 1998.

DE NARDI, A. B. *et al.*: Prevalência de Neoplasias e Modalidades de Tratamento em Cães, Atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

EVANS W. H., MARTIN P. E. Gap junctions: structure and function. *Molecular Membrane Biologic*. v.19, p.121-136, 2002.

FELICIANO, M.A.R *et al.*: Neoplasia mamária em cadelas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX , n.1, 2012.

GOSWAMI S. *et al.*: Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. **Cancer Res.**, v.65, p.5278-5283, 2005.

HAGA S. *et al.*: Overexpression of p53 gene product in canine mammary tumors. **Oncol. Rep.**, v.8, p.1215-1219, 2001.

HANSEN K., KHANNA C. Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development. **Eur. J. Cancer**, v.40, p.858-880, 2004.

HOFFMAN M.M., BIRNEY E. Estimating the neutral rate of nucleotide substitution using introns. **Mol. Biol.Evol.**, v.24, p.522-531, 2007.

HOVEY R.C., MCFADDEN T.B., AKERS RM. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v.4, p.53-68, 1999.

HSU S., RAINE L., FANGER H. Use of avidin-biotin-peroxidase techniques: A comparasion between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.29, p.577-580, 1981.

JAMIESON S. *et al.*: Expression of gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in normal human breast and in breast tumors. **J. Pathol.**, v. 184, p.37-43, 1998.

JIANG J. X., PENUELA S. Connexin and pannexin channels in câncer. **BMC Cell Biology**, v.17(suppl 1):12, 2016.

KAR R., BATRA N., RIQUELME M. A., JIANG J. X. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. **Archives Biochemistry Biophysics**, v.524, n.1, p.2-15, 2012.

KHANNA *et al.*: Dog as Cancer Model, Nature Publishing Group, **Nature Biotechnology**, v.24, n. 9, p. 1065-1066, 2006.

KNAPP D.W., WATERS D.J. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. **Mol. Med. Today**, v.3, p.8-11, 1997.

KRUTOVSKIKH V. A., MESNIL M., MAZZOLENI G., YAMASAKI H. Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by promoting agents in vivo: association with aberrant localization of connexin proteins. **Laboratory Investigation**, v.72, n.5, p.571-577, 1995.

KRUTOVSKIKH V., MIRONOV N., YAMASAKI H. Human connexin 37 is polymorphic but not mutated in tumours. **Carcinogenesis**, v.17, n.8, p.1761-1763, 1996.

LAIRD D.W. The gap junction proteome and its relationship to disease. **Trends Cell. Biol.**, v.20, p. 92-101, 2010.

LANA *et al.*: Tumors of the Mammary Gland. In: WITHOROW *et al.*: Withrow & Mac Ewen's **Small Animal Clinic Oncology**, 4 ed. Saunders Company, p. 619-636, 2007.

LINDBLAD-TOH *et al.*: Genome Sequence, Comparative Analysis and Haplotype of the Domestic Dog. **Nature**, v. 438, p. 803-819, 2005.

MCLACHLAN E., SHAO Q., LAIRD D. W. Connexins and Gap Junctions in Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. **Journal Membrane Biology**, v.218, p.107-121, 2007.

MESE G., RICHARD G., WHITE T. W. Gap junctions: basic structure and function. **Journal of Investigative Dermatology**, V.127, p.2516-2524, 2007.

MESNIL M. Connexins and cancer. **Biology of the Cell**, v.94, p.493-500, 2002.

MESNIL M., CRESPIAN S., AVANZO J. L., DAGLI M. L. Z. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1719, p.125-145, 2005.

MISDORP W.: Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN D.J. (ed.): **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa State, p. 575-606, 2002.

MISDORP, W. *et al.*: Definitions and Explanatory Notes. Who Historical Classifications of Mammary Tumors of the Dog and Cat. **Washington: Armed Forces Institute of Pathology**, p.18-27, 1999.

NANDI S., GUZMAN R.C., YANG J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.3650-3657, 1995.

OZAKI K., YAMAGAMI T., NOMURA K., NARAMA I. Mast cell tumors of the gastrointestinal tract in 39 dogs. **Vet. Pathol.**, v.39, p.557-564, 2002.

PANCHIN Y. *et al.*: A ubiquitous family of putative gap junctions molecules. **Current Biology**, v.10, p:473-474, 2000.

PENUELA S. *et al.*: The biochemistry and function of pannexin channels. **Biochim Biophys Acta**, doi: 10.1016/j.bbamem.2012.01.017, 2012.

PENUELA S., LAIRD D. W. The cellular life of pannexins. **WIREs Membr Transp Signal**, v.1, p:621-632, doi:10.1002/wmts.63, 2012.

PENUELA S., HARLAND L., SIMEK J., LAIRD D.W. Pannexin channels and their links to human disease. **Biochemistry Journal**, v.461(3), p.371-381, 2014.

PFENNINGER A., WOHLWEND A., KWAK B. R. Mutations in connexin genes and diseases. **European Journal of Clinical Investigation**, v.41, p.103-116, 2011.

POLLARD J.W. Role of colony-stimulating factor-I in reproduction and development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.46, p.54-60, 1997.

PORRELLO A., CARDELLI P., SPUGNINI E.P. Oncology of companion animals as a model for humans an overview of tumor histotypes. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.25(1), p.97-105, 2006.

POZZI A. *et al.*: Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland. **Experimental Cell Research**, v.220, n.1, p.212-219, 1995.

RUNGSIPAT A. *et al.*: Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, p.27-32, 1999.

SCHALPER K.A. *et al.*: Possible role of hemichannels in cancer. **Frontiers in Physiology**, v.5 (237), p.1-18, doi: 10.3389/fphys.2014.00237, 2014.

SCHWERTFEGER K.L., ROSEN J.M., COHEN D.A. Mammary gland macrophages: pleiotropic functions in mammary development. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v.11, p.229-238, 2006.

SETOGUCHI, A. *et al.*: Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.62, p.433-439, 2001.

SOHL G., WILLECKE K. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovascular Research**, v.62, p.228-232, 2004.

SORENMO, K.U *et al.*: Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.48(1), p.85-97, 2011.

STEWART M. K., SIMEK J., LAIRD D.W. Insights into the role of connexins in mammary gland morphogenesis and function. **Reproduction**, v.149(6), p:279-290, 2015. doi: 10.1530/REP-14-0661.

STORB, R. *et al.*: Marrow Engraftment by Allogeneic Leukocytes in Lethally Irradiated Dogs. **Blood**, v.30, p.805-811, 1967.

TELEKI *et al.* Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis. **PLoS ONE**, v.9, n.11, e.112541, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0112541

TORRES *et al.* Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. **Veterinary Pathology**, v.42, p.633-641, 2005.

TROSKO J. E, CHANG C. C., MADHUKAR B. V., KLAUNIG J. E. Chemical, oncogene and growth factor inhibitions of gap junctional intercellular communication: na integrative hypothesis of carcinogenesis. **Pathobiology**, v.58, p. 265-278, 1990.

TSOI, M.S. *et al.*: Lymphocyte Reactivity to Autochthonous Tumor Cells in Dogs with Spontaneous Malignancies. **Cell Immunology**, v.13, p.431-439, 1974.

VARGO-GOGOLA T, ROSEN J. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature reviews Cancer**, v.7, p.659-672, 2007.

VINKEN M. *et al.* Connexins and their channels in cell growth and in cell death. **Cellular Signalling**, v.18, p.592-600, 2006.

WEI C. J., XU X., LO C. W. Connexins and cell signaling in development and diseases. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p.811-838, 2004.

YAMASAKI H. Gap junction intercellular communication and carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.11, n.7, p.1051-1058, 1990.

YAMASAKI H., NAUS C. G. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n.6, p.1199-1213, 1996.

APÊNDICE

CEUA_UESC Comissão de Ética no Uso de Animais <ceuauesc@gmail.com>

Para

cintia morais

08/10/15 às 1:02 PM

Oi Cíntia, boa tarde.

Em reunião realizada na última sexta-feira, após análise de parecer, ficou deliberado que o seu projeto, pelo fato de não incluir a manipulação ou manejo de animais vivos, não necessita de aprovação por parte dessa comissão de ética.

Qualquer dúvida estamos à disposição.

Atenciosamente,

Guilherme - coordenador CEUA-UESC

[Mostrar mensagem original](#)

[Responder](#) [Responder a todos](#) [Encaminhar Mais](#)

ANEXO

Protocolo de Imunofluorescência – Cultivo celular

Preparo das células na placa de 6 poços

- Prepare a placa de 6 poços colocando as lamínulas de 22 x 22 mm em cada poço, irradiar por 15 minutos na luz ultravioleta. Depois de esterilizar as lamínulas pode colocar as células de interesse nesta placa com seu respectivo meio de cultivo e deixe crescer até atingir confluência de 70-80%. Quando já estiver confluyente retirar o meio de cultivo e lave com 2 mL de PBS 1x estéril, retirar o PBS e acrescentar 2 mL de etanol 70% e levar a incubar a -20°C por 10 minutos. Ao passar este tempo retire o etanol 70% e coloque novamente o PBS 1x estéril. Estas células fixadas devem ser armazenadas na geladeira com um volume de 2 mL de PBS 1x até o dia da imunofluorescência.

1º DIA

- Para iniciar a imuno faça uma lavagem com PBS 1X + Triton X100 (para cada litro de PBS 1x acrescente 1000µl de Triton-X100), por 10 minutos a temperatura ambiente. Esta solução vai enfraquecer a bicamada lipídica e permeabilizar a membrana celular.
- Enquanto isso....
- Aquecer a solução tampão EDTA 1x pH 9.0, no micro-ondas por 10 minutos, retire a solução de PBS + Triton-X100 e acrescente 2ml deste EDTA quente, esta solução vai aumentar a exposição de antígenos nucleares. No caso de antígenos de membrana ou citoplasmáticos pode usar a solução de citrato.

- Enquanto isso...
- Identifique novas placas e recorte o parafilme em pedaço de aproximadamente 22x22mm, e então coloque dentro de cada poço e reserve. Este parafilme lhe ajudará a poupar o anticorpo.
- Deposite no parafilme 100ul de cada anticorpo previamente diluído para a incubação. OBS: Diluir os anticorpos conforme proposto no Data Sheet e observar o método de exposição antigênica descrito. Quanto a diluição, normalmente realizamos 1:100 quando não é informada esta diluição no Data Sheet. Quanto ao método de exposição antigênica este poderá ser pelo EDTA pH 9,0 ou pelo citrato pH 6,0.
- Procure manter as lâminas sempre no PBS e somente no momento de incubação com o anticorpo primário (policlonal ou monoclonal), retire a lamínula com o auxílio de uma agulha com a ponta curva (improvisamos no lab.), então coloque a face em que as células estão aderidas em contato com o anticorpo depositado no parafilme. Incubar as lâminas em câmara úmida, na geladeira *overnight*.