

Modelo experimental de carcinoma mamário em ratas induzidas com 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene

Laura Ferreira de Rezende¹, Eunice Cristina da Silva Costa², Natália Guimarães de Moraes Schenka³, André de Almeida Schenka⁴, Lindsay Pâmela Untura⁵, Gilberto Uemura⁶

Descritores

Neoplasias da mama/
induzido quimicamente
9,10-Dimetil-1,2-
benzantraceno/
administração & dosagem
Modelos animais
Ratas

Keywords

Breast neoplasms/
chemically induced
9,10-Dimethyl-1,2-
benzanthracene/
administration & dosage
Models, animal
Ratos

RESUMO

Objetivo: Testar um modelo experimental de indução de carcinogênese em ratas Sprague-Dawley. **Métodos:** Foram estudadas 30 ratas fêmeas virgens Sprague-Dawley, induzidas ao carcinogênese mamário. Com 50 dias de vida, foi injetado 7,12-dimetilbenz(a)antraceno no ventre por gavage. Com 12 semanas, as glândulas mamárias foram examinadas, assim como os tecidos cerebrais, pulmonares, ossos do fêmur e fígado. **Resultados:** Doze semanas após a injeção de DMBA, 85% das ratas apresentaram pelo menos um tumor mamário visível. **Conclusão:** O modelo experimental de carcinoma mamário induzido por DMBA mostrou-se efetivo e de fácil reprodução.

ABSTRACT

Objective: To test an experimental model of chemical mammary carcinogenesis induction in Sprague-Dawley rats. **Methods:** Thirty virgin Sprague-Dawley female rats, aged 50 days, received 20 mg of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) intragastrically by gavage. At 12 week their mammary glands were examined. Brain, liver, bone and lung tissue were also analyzed. **Results:** Twelve weeks after DMBA injection, 85% rats presented at least one breast tumor. **Conclusion:** This experimental animal model of chemical mammary induced carcinogenesis is feasible and can be used in further experiments on the role of tumorigenic biomodulator substances.

Introdução

O câncer de mama apresenta grandes e significativos índices de mortalidade entre as mulheres, sendo que, no Brasil, é o mais incidente entre a população feminina e é responsável por 49.240 novos casos, com o risco estimado de 49 casos para cada 100 mil mulheres¹.

Considerando a alta prevalência e o aumento da incidência do câncer de mama, fazem-se cada vez mais necessárias pesquisas para o desenvolvimento de novas técnicas e de novas drogas para

Trabalho realizado no Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – UNIFAE – São João da Boa Vista (SP), Brasil.

¹ Pós-doutoranda do Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP) – Brasil; Professora do Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – UNIFAE – São João da Boa Vista (SP), Brasil.

² Doutora; Professora do Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – UNIFAE – São João da Boa Vista (SP), Brasil.

³ Doutora em Ciências Médica pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

⁴ Doutor; Professor Assistente do Departamento de Farmacologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – Campinas (SP), Brasil.

⁵ Graduanda em Fisioterapia do Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino – UNIFAE – São João da Boa Vista (SP), Brasil.

⁶ Doutor; Professor Assistente da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Botucatu (SP), Brasil

Endereço para correspondência: Laura Ferreira de Rezende Franco, Largo Engenheiro Paulo A Sandeville, 15, Santo André, CEP 13870-000, São João da Boa Vista (SP), Brasil, Telefone: (19) 3623-3022, ramal 224 ou 236, e-mail: laura@fae.br

Não há conflitos de interesse.

Recebido em: 08/12/2009. **Aceito após modificações:** 24/03/2010

aumentar a sobrevida das pacientes. Entretanto as pesquisas em caráter inicial ou que ainda não sejam seguras para testes em humanos devem ser testadas em modelos experimentais da doença.

Modelos experimentais de indução química de carcinogênese mamária em ratas já foram testados no Brasil por Barros et al.². Com 47 dias de vida, 20 ratas Sprague-Dawley, jovens e virgens, receberam por gavagem intragástrica 20 mg de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). Oito semanas depois da injeção de DMBA, 16 ratas apresentavam tumor nas mamas (80%). Com 13 semanas, todas desenvolveram carcinomas de mama (100%), que foram confirmados por análise histopatológica, evidenciando que esse modelo experimental de indução química de carcinogênese mamária é factível.

Roomi et al.³ utilizaram o N-methyl-N-nitrosourea (MNU) para desenvolver câncer de mama em 20 ratas Sprague-Dawley com 50 dias. Seis semanas após a administração, os tumores já eram palpáveis em 100% das ratas, com características de adenocarcinoma. Entretanto, Esendagli et al.⁴ sugerem a coexistência de diferentes tipos de neoformação tumoral além do carcinoma com o uso de MNU, o que acaba interferindo nos procedimentos e nos resultados de experimentos com esse modelo.

Ratas Sprague-Dawley são escolhidas devido à semelhança entre a estrutura histológica do tumor da sua glândula mamária com a humana. Indução de carcinoma mamário em ratas fêmeas é um dos modelos animais mais frequentes na investigação de carcinogênese da mama e tratamentos para câncer de mama³.

Sprague-Dawley e Wistar-Furth ratas fêmeas são os animais com maior suscetibilidade à indução química da carcinogênese mamária^{5,6}.

Prejean et al.⁷ observaram, em estudo com 181 ratas fêmeas Sprague-Dawley, que a ocorrência espontânea de câncer de mama foi de 30% em um acompanhamento de 540 dias. Entre os 179 machos, o aparecimento foi de 1%. Dos tumores encontrados nas 54 fêmeas, 43 eram fibroadenoma, 2 adenoma lobular e 13 adenocarcinomas lobulares.

O desenvolvimento espontâneo de tumores mamários, além de apresentar maior incidência entre 600 e 700 dias de vida, aparece em número mais significativo depois da metade da idade reprodutiva, entre 450 e 540 dias de vida⁸.

Dessa forma, não são viáveis estudos a partir da ocorrência espontânea de tumores, sendo, então, de fundamental importância o desenvolvimento de modelos experimentais de carcinoma mamário para observações e intervenções científicas.

Métodos

Animais

Foram estudadas 30 ratas fêmeas virgens Sprague-Dawley criadas no Biotério do Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino (UNIFAE) induzidas ao carcinogênese mamária. Com 50 dias de vida, foi injetado DMBA no ventre.

As ratas foram alimentadas com ração (Purina® para roedores) e água *ad libitum* em ciclo fotoperiódico de 12 horas claro e 12 horas escuro, a 22 ± 2 °C.

Indução do tumor

O carcinoma mamário foi induzido por meio de uma única dose de 20 mg de DMBA diluída em óleo de soja (1 mL) dada intragastricamente por gavagem².

Cirurgia

As ratas foram anestesiadas com xilazina (5 a 13 mg/kg), que-tamina (40 a 87 mg/kg) e atropina e, em seguida, houve a retirada dos 8 pares de mamas das ratas após o crescimento por 90 dias do carcinoma mamário. Foi feita antibioticoterapia durante a cirurgia (pentabiótico e terramicina). Após esses procedimentos, as ratas foram sacrificadas e foi realizada a necropsia de seus órgãos. A morte das ratas ocorreu na presença de um médico veterinário.

Após as ressecções cirúrgicas, o material foi encaminhado para a análise de peso e volume do tumor, além da característica celular. Foi avaliada também a presença de metástases microscópicas e macroscópicas. Foram retiradas as vísceras em bloco, além dos dois ossos fêmures e do tecido cerebral. O peso das ratas foi acompanhado semanalmente pelos pesquisadores.

Patologia mamária

Foram realizados cortes a partir dos blocos de parafina contendo as amostras de mama. Inicialmente, foi realizada a desparafinização dos blocos de parafina com bloqueio da peroxidase endógena e recuperação antigênica. Posteriormente, foi pingado o anticorpo primário específico e levado para incubação em câmara úmida. Depois de retiradas, as lâminas da câmara úmida foram colocadas na geladeira *overnight*. Ao serem retiradas da geladeira, as lâminas foram lavadas e receberam o sistema *Envision Peroxidase*; depois, foram contracoloradas com hematoxilina de Mayer, lavadas, desidratadas e montadas.

Todas as lâminas foram interpretadas por dois médicos patologistas com índice 1,0 de concordância.

Aspectos éticos

Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos e Animais da UNIFAE.

Resultados

Foram acompanhadas as massas das ratas semanalmente, sendo a média total de 268 g (± 33). Os tumores tornaram-se visíveis a partir da quarta semana após a indução. Quatro ratas morreram antes das 12 semanas e não puderam ser avaliadas. Dessa maneira, a amostra ficou reduzida a 26 ratas, sendo que em quatro ratas (15%) não foram visualizados tumores.

Doze semanas após a indução, 85% das ratas apresentaram desenvolvimento de câncer de mama (Figura 1).



Figura 1. Ratas com indução do carcinoma mamário.

Histologicamente, todos os tumores foram carcinoma mamário misto, com componentes tubulares, lobulares e papilíferos (Figuras 2 e 3), sendo 27% bem diferenciados e 73% moderadamente diferenciados. Não foi observada presença de metástases à distância em nenhum dos órgãos estudados.

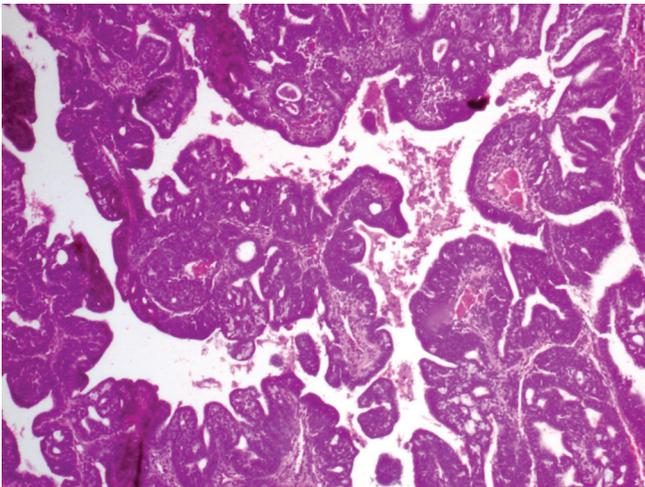


Figura 2. Fotomicrografia ilustrativa de carcinoma mamário de rata com padrão papilífero (hematoxilina-eosina, 40X).

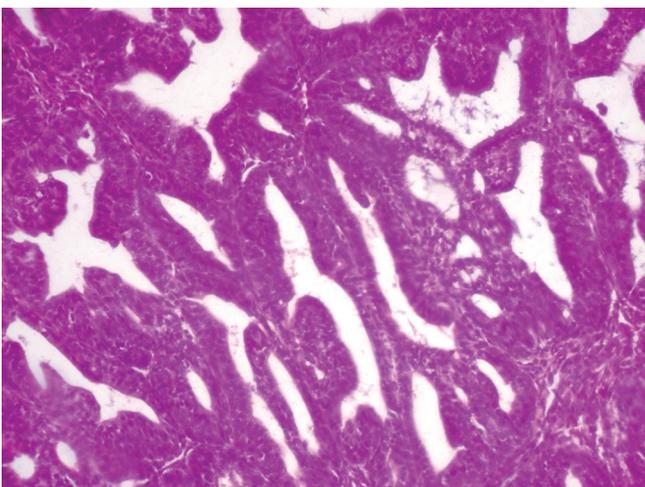


Figura 3. Fotomicrografia ilustrativa de carcinoma mamário de rata com padrão tubular (hematoxilina-eosina, 100X).

Discussão

A proposta deste estudo foi testar um modelo experimental de indução química de carcinogênese de mama para que futuros estudos possam ser realizados a partir de intervenções externas.

A idade da rata é um fator importante a ser observado, uma vez que a eficácia da indução parece ser fortemente idade-dependente. O tempo de indução utilizado nesse estudo foi de 50 dias. O estágio do desenvolvimento da glândula mamária influencia a suscetibilidade de desenvolvimento da carcinogênese, havendo maior sensibilidade na puberdade⁹.

O tipo histológico encontrado foi carcinoma mamário misto, com componentes tubulares, lobulares e papilíferos, sem metástase à distância. Observa-se uma significativa proliferação de células epiteliais e mioepiteliais, o que justifica a agressividade local do tumor, mas sem que a membrana basal seja ultrapassada. Esse achado de ausência de metástase neste modelo experimental concorda com Barros et al.², que também não observou disseminação tumoral.

Estudos em fases iniciais e com proposta de intervenção são temerosos em humanos, devido ao risco de aumento de incidência de recidiva local ou de metástase à distância. O desenvolvimento de estudos que reproduzam com resultados satisfatórios modelos experimentais de carcinoma mamário contribui muito para o desenvolvimento de técnicas de reabilitação, uma vez que torna possível a intervenção de recursos teoricamente danosos aos seres humanos.

Ratas Sprague-Dawley, que são geneticamente imunodeficientes, são de fácil acesso no país, de fácil reprodução e criação em laboratório e de custo viável. Além disso, apresentam taxas de carcinomas mamários espontâneos maiores que as outras raças e o desenvolvimento do tumor induzido pode ser observado macroscopicamente em poucas semanas.

Considerações finais

O modelo proposto alcançou 85% de sucesso com 12 semanas de acompanhamento, mostrando-se efetivo como modelo experimental de carcinoma mamário.

Financiamento

Estudo financiado pelo Programa de Auxílio à Pesquisa Científica (PAPEC) do Centro Universitário da UNIFAE – São João da Boa Vista (SP), Brasil.

Referências

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa de câncer para 2010 [Internet]. [citado 2009 Dez 8]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>

2. Barros ACSDB, Muranaka ENK, Mori LJ, Pelizon CHT, Iriya K, Giocondo G, et al. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo*. 2004;59(5):257-61.
3. Roomi MW, Roomi NW, Ivanov V, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Modulation of N-methyl-N-nitrosourea induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats by combination of lysine, proline, arginine, ascorbic acid and green tea extract. *Breast Cancer Res*. 2005;7(3):R291-5.
4. Esendagli G, Yilmaz G, Canpinar H, Gunel-Ozcan A, Guc MO, Guc D. Coexistence of different tissue tumorigenesis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinoma model: a histopathological report in Sprague-Dawley rats. *Lab Anim*. 2009;43(1):60-4.
5. Dias MF, Souza 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. *Breast J*. 2000;6(1):14-9.
6. Guillino PM, Pettingrew HM, Grantham FIT. N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. *J Natl Cancer Inst*. 1975;54(2):401-14.
7. Prejean JD, Peckham JC, Casey AE, Griswold DP, Weisburger EK, Weisburger JH. Spontaneous tumors in Sprague-Dawley rats and Swiss mice. *Cancer Res*. 1973;33(11):2768-73.
8. Durbin PW, Williams MH, Jeung N, Arnold JS. Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague-Dawley) rat: the influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res*. 1966;26(3):400-11.
9. Gear RB, Yan M, Schneider J, Succop P, Heffelfinger SC, Clegg DJ. Charles River Sprague Dawley rats lack early age-dependent susceptibility to DMBA-induced mammary carcinogenesis. *Int J Biol Sci*. 2007;3(7):408-16.