

O PAPEL DO RATO NA INVESTIGAÇÃO BIOMÉDICA

THE ROLE OF RAT IN BIOMEDICAL RESEARCH

A. Faustino-Rocha^{1,2*}, A. Alvarado^{1,2}, P. Oliveira^{1,3}

¹Centro de Investigação e de Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB), Vila Real, Portugal; ²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT), Lisboa, Portugal; ³Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Vila Real, Portugal.

*Autor correspondente: p5350@ulusofona.pt

Resumo: Os animais têm sido usados desde há muitos anos na pesquisa biomédica, para estudar e compreender diversos aspetos das doenças, nomeadamente a sua etiologia, patogenia, progressão, base molecular e genética, e testar novos tratamentos. O rato e o murganho são os animais mais frequentemente utilizados na Europa como modelos de doença. O cancro é a principal causa de morte em todo o mundo. O nosso grupo de investigação tem usado o rato como modelo para o estudo de alguns dos tipos de cancro mais frequentes, como o cancro da mama e da próstata, contribuindo para um melhor conhecimento do desenvolvimento e progressão desta doença, e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes, que possam melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevivência dos doentes oncológicos.

Palavras-chave: mama, oncologia, modelo, próstata, roedores

Abstract: Since early times, animals have been used in biomedical research for the study and understanding of several aspects of diseases, namely their etiology, pathogenesis, molecular and genetic basis, and to develop and test new therapies. The rat and mouse are the animals most frequently used as models in Europe. Cancer is the main cause of death worldwide. Our research team has used the rat as model to study some of the most frequent types of cancer, such as breast and prostate cancer, contributing for a better understanding of the development and progression of this disease, and for the development of more efficient therapies that may improve the quality of life and lifespan of oncologic patients.

Keywords: breast, oncology, model, prostate, rodents

1. INTRODUÇÃO

Desde há muitos séculos, os animais desempenham um papel fundamental na pesquisa biomédica. Os animais foram inicialmente utilizados pelos investigadores para uma melhor compreensão da anatomia e fisiologia do corpo humano. Os primeiros estudos com recurso à utilização de animais foram realizados pelos Babilónios e Assírios (2000 a.C.), com o objetivo de realizar cirurgias em animais. Mais tarde, o filósofo grego Aristóteles (384-322 a.C.), considerado o fundador da Biologia e um dos principais pensadores, utilizou animais com o objetivo de estudar as diferenças internas entre as várias espécies. Os estudos desenvolvidos por Aristóteles foram devidamente documentados e disseminados por diversos países, contribuindo para a utilização dos animais como uma ferramenta de estudo em diversos países Árabes e Europeus (Ericsson *et al.*, 2013). Nos anos 340-258 a.C., Erasistratus também desenvolveu alguns ensaios com animais. Desde então, os animais têm sido frequentemente utilizados na investigação biomédica. No último século, 70% dos estudos nas áreas da Fisiologia e da Medicina galardoados com o prémio Nobel usaram animais como modelos de doença, e 30% dos estudos basearam-se em conhecimentos previamente adquiridos com modelos animais (Badyal & Desai, 2014). Atualmente, os modelos animais representam uma importante ferramenta para o estudo das mais diversas doenças, nomeadamente as doenças cardiovasculares, o Alzheimer, a obesidade, a diabetes, a paralisia cerebral e o cancro, entre muitas outras doenças.

2. MODELOS ANIMAIS

O termo modelo animal surgiu como consequência de uma visão antropocêntrica. O Homem elaborou uma escala zoológica, tendo assumido o primeiro lugar na evolução das espécies. Assim, surgiu a dicotomia animal-humano, levando à criação da designação modelo animal.

De acordo com o *National Cancer Institute* (National Cancer Institute, 2019), um modelo animal é um animal com uma doença humana ou com uma doença semelhante à doença humana. Estes modelos animais são usados para estudar e compreender diversos aspetos das doenças, nomeadamente a sua etiologia, patogenia, progressão, base molecular e genética, e para desenvolver e testar tratamentos mais eficazes, que possam aumentar sobrevivência e a qualidade de vida dos doentes (Clarke, 1996; Liska *et al.*, 2003; Iannaccone & Jacob, 2009; Faustino-Rocha *et al.*, 2015;). Um modelo animal de doença ideal deve ser simples, pouco dispendioso e o mais semelhante possível com o Homem (Fagundes & Taha, 2004).

Diferentes espécies, tais como peixes, aves, répteis, coelhos, ratos, murganhos, cães, ungulados (porco, ovelha) e primatas não-humanos, podem ser usados como modelos animais. Considerando as inúmeras espécies disponíveis, os investigadores deverão ser capazes de escolher a espécie que melhor se adapta ao estudo que pretendem desenvolver (Conn, 2013). Aquando da seleção de um modelo animal, o investigador deve ter em consideração: o objetivo do estudo, as espécies disponíveis, as vantagens e desvantagens de cada espécie, o custo dos animais, as despesas de manutenção, a facilidade de manipulação, os equipamentos necessários e as considerações éticas (Gulden *et al.*, 1999; Fagundes & Taha 2004).

A utilização de animais para fins experimentais na Europa obedece à legislação da União Europeia (Diretiva Europeia 2010/63/UE) e de cada país. No caso de Portugal, a utilização destes animais é regulada pelo Decreto-Lei 113/2013, de 7 de agosto. De acordo com os dados estatísticos divulgados pela União Europeia (UE) sobre o número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos Estados-Membros, no ano de 2011 foram usados aproximadamente 11,5 milhões de animais (Comissão Europeia, 2013). Este valor representa uma redução em mais de

meio milhão de animais relativamente aos dados apresentados no relatório relativo ao ano de 2008. Os roedores representam aproximadamente 80% dos animais usados na União Europeia. O murganho (*Mus musculus*) (60,96%), seguido do rato (*Rattus norvegicus*) (13,96%), são os animais mais frequentemente utilizados. De acordo com os dados do relatório, no ano de 2011 não foi usado qualquer primata para fins experimentais na UE. Seguindo a tendência observada na UE, os dados divulgados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária relativamente à utilização de animais para fins experimentais no ano de 2017, revelam que o murganho (88,18%, 46720 animais) e o rato (5,92%, 3135 animais) são os animais mais utilizados em Portugal, representando 94% dos animais usados (DGAV, 2017).

Quando comparados com outras espécie, o murganho e o rato apresentam diversas vantagens, nomeadamente: a sua fisiologia e genética são bens conhecidas, são animais de pequenas dimensões, fáceis de alojar e manipular, são animais relativamente baratos, a sua utilização é aprovada pela legislação em vigor para a utilização de animais para fins experimentais, e são mamíferos com inúmeras semelhanças com os humanos, como a sua anatomia, fisiologia, genética e bioquímica (Cardiff, 2007; Iannaccone & Jacob, 2009).

3. O CANCRO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro vitimou aproximadamente 9,6 milhões de pessoas no ano de 2018, sendo considerado a principal causa de morte em todo o mundo (WHO, 2018). O cancro ocorre em várias etapas ligadas entre si (iniciação, promoção, progressão e metastização) e pode desenvolver-se durante vários anos. A **iniciação** caracteriza-se por uma alteração irreversível do ADN, levando à conversão de uma célula normal numa célula iniciada. Esta alteração no ADN pode ocorrer como consequência da exposição a agentes carcinogénicos físicos (radiação ultravioleta,

radiação ionizante), químicos (aflatoxinas, arsénio, asbestos, componentes do tabaco) e biológicos (*Helicobacter pylori*, *Schistosoma hematobium*, papilomavírus, vírus da hepatite B, vírus da hepatite C, vírus Epstein-Barr). A **promoção** é considerada uma fase relativamente lenta e reversível, durante a qual as células iniciadas crescem e se dividem descontroladamente devido à acumulação de alterações genéticas, originando uma população de células pré-neoplásicas. A promoção pode ser revertida pela administração de fármacos quimioterápicos. A **progressão** caracteriza-se pelo rápido crescimento da lesão neoplásica. Nesta fase do processo de carcinogénese, as células pré-neoplásicas convertem-se em células neoplásicas devido à acumulação de alterações genéticas. A **metastização** é um processo complexo, durante o qual ocorre a disseminação das células neoplásicas para órgãos distantes, pela corrente sanguínea ou linfática. A capacidade de metastização é exclusiva das neoplasias malignas, no entanto é importante realçar que nem todas as neoplasias malignas metastizam (Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Eickmeyer *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Considerando que o cancro é a principal causa de morte em todo o mundo, o nosso grupo de investigação tem-se dedicado ao estudo de diversos tipos de cancro em modelos animais, com vista a uma melhor compreensão do desenvolvimento e progressão da doença, e ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes, capazes de aumentar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida dos doentes oncológicos

4. O RATO (*Rattus norvegicus*) COMO MODELO DE CANCRO DE MAMA

O cancro da mama é um dos principais tipos de cancro diagnosticados na população feminina em todo o mundo. No ano de 2018, foram diagnosticados 2,09 milhões de novos casos de cancro da mama, tendo vitimado 627 000 pessoas (WHO, 2018).

O desenvolvimento de cancro da mama num rato do sexo feminino foi descrito pela primeira vez em 1938 por Mceuen após a administração intravaginal diária de uma solução de estrona dissolvida em óleo de milho, durante dois anos e meio (Mceuen, 1938). Desde então, os ratos do sexo feminino têm sido continuamente usados e constituem um dos principais modelos para o estudo do cancro da mama (Cardiff, 2007). A glândula mamária do rato é semelhante à glândula mamária da mulher em diversos aspetos, nomeadamente: na resposta aos estrogénios, na histologia, e nas características bioquímicas, moleculares e genéticas (Mullins *et al.*, 2002; Hoenerhoff *et al.*, 2011). O rato apresenta duas cadeias mamárias (esquerda e direita) com seis glândulas mamárias em cada uma das cadeias (três glândulas mamárias torácicas e três glândulas mamárias inguinais) (Maeda *et al.*, 2000). Ao contrário do que acontece na mulher, as glândulas mamárias do rato são pouco desenvolvidas e são identificáveis externamente apenas pela presença do mamilo. As glândulas mamárias do rato são vascularizadas por ramos da artéria cervical superficial, das artérias torácica externa e interna, da artéria pudenda externa e da artéria axilar (Maeda *et al.*, 2000).

O desenvolvimento espontâneo de cancro da mama no rato é dependente da idade, ocorrendo após o primeiro ano de idade (McMartin *et al.*, 1992; Oishi *et al.*, 1995; Son *et al.*, 2010; Ikezaki *et al.*, 2011). O modelo de cancro da mama pode ser obtido pela administração de substâncias carcinogénicas ou hormonas, pela exposição a agentes carcinogénicos físicos (radiação), pela implantação de células neoplásicas, ou pela utilização de animais geneticamente modificados (Russo & Russo 1996; Shull *et al.*, 1997; Bartstra *et al.*, 1998; Smits *et al.*, 2007).

A administração de agentes químicos constitui o modelo mais frequentemente usado. Do ponto de vista químico, um agente carcinogénico químico é qualquer composto capaz de induzir o desenvolvimento de cancro num tecido (Oliveira *et al.*, 2007). Os

primeiros estudos de carcinogénese mamária quimicamente induzida em ratos foram descritos por Howell, em 1963 (Howell, 1963). O 7,12-dimetilbenz(a)-antraceno (DMBA) e a *N*-metil-*N*-nitrosureia (MNU) são os agentes químicos mais frequentemente usados. A MNU é o agente mais usado, pois ao contrário do DMBA, a MNU é um agente alquilante de ação direta que não requer ativação metabólica para induzir alterações irreversíveis no ADN (Doctores *et al.*, 1974; Murray *et al.*, 2009). O desenvolvimento de cancro da mama pode ser induzido pela administração intraperitoneal da MNU, numa dose de 50 mg/kg, aos 50 dias de vida. Embora a MNU possa ser administrada por outras vias, como a via subcutânea, intravenosa e oral, a taxa de incidência é mais elevada quando administrada por via intraperitoneal. Embora existam diversas estirpes de ratos disponíveis para o estudo do cancro da mama, nomeadamente August, ACI, Fisher 344, Marshall e ratos nude (rnu/rnu), o rato da estirpe Sprague-Dawley é o mais frequentemente usado devido à maior sensibilidade aos carcinogénicos químicos (Boylard & Sydnor, 1962).

O nosso grupo de investigação desenvolveu um projeto com o objetivo de avaliar os efeitos do exercício físico moderado, de longa duração, no desenvolvimento de cancro da mama em ratos do sexo feminino. Cinquenta ratos Sprague-Dawley do sexo feminino, com quatro semanas de idade, foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: MNU sedentário (n=15), MNU exercitado (n=15), controlo sedentário (n=10) e controlo exercitado (n=10). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), sob condições controladas de temperatura (23±2°C), humidade (50±10%), filtração de ar (10-20 filtrações/hora), e ciclo de luz/escuridão (12h/12h). Os animais foram alimentados com uma dieta de laboratório (4RF21[®], Mucedola, Itália) e água *ad libitum*. Os procedimentos seguiram a legislação em vigor na UE e em Portugal para a utilização de animais para fins experimentais, e foram

aprovados pela Comissão de Ética (aprovação n.º 008961). Às sete semanas de idade, os animais dos grupos MNU receberam uma injeção intraperitoneal do agente carcinogénico MNU (ISOPAC[®], Sigma, Espanha), numa dose de 50 mg/kg. Os animais dos grupos controlo receberam uma injeção de veículo (soro fisiológico 0,9%). Após a administração, os animais dos grupos exercitados (MNU e controlo) foram exercitados num tapete rolante (Treadmill Control[®], Harvard Apparatus, EUA), a uma velocidade de 20 m/min, 60 min/dia, 5 dias/semana, durante 35 semanas. A vascularização das neoplasias foi avaliada por ecografia durante o ensaio (modos *Power Doppler*, *B Flow* e contraste) e após o final do ensaio por imunohistoquímica (imunomarcagem do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)-A). Às 42 semanas de idade, os animais foram sacrificados pela administração intraperitoneal de cetamina (75 mg/kg, Imalgene[®] 1000, Merial, França) e xilazina (10 mg/kg, Rompun[®] 2%, Bayer, Alemanha), seguida da exsanguinação por punção cardíaca, como indicado pela *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) (Forbes, 2007) e foi realizada uma necropsia completa em todos os animais.

Após a análise dos dados, verificou-se que os animais dos grupos MNU apresentaram uma menor massa corporal, quando comparados com os animais controlo. A massa do baço foi mais elevada nos animais expostos ao agente carcinogénico ($p < 0,05$), sugerindo uma resposta inflamatória decorrente do processo de carcinogénese (Ueno *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2011). A concentração sérica da interleucina-6 (IL-6) e da proteína C-reativa (CRP) foram mais elevadas nos grupos MNU ($p < 0,05$). Nos grupos MNU, os níveis de IL-6 e CRP foram mais elevados no grupo sedentário, quando comparado com o grupo exercitado, sugerindo um efeito anti-inflamatório do exercício físico moderado de longa duração (Murphy *et al.*, 2011). Como esperado, os animais dos grupos controlo não

desenvolveram qualquer lesão mamária. Todos os animais expostos à MNU desenvolveram neoplasias (incidência de 100% nos grupos MNU sedentário e MNU exercitado). A primeira neoplasia foi detetada por palpação no grupo MNU sedentário, 10 semanas após a administração da MNU. A primeira neoplasia mamária do grupo MNU exercitado foi observada duas semanas mais tarde, 12 semanas após a administração da MNU. No final do protocolo experimental, o número de neoplasias mamárias foi mais elevado no grupo MNU sedentário (28 neoplasias; $2,55 \pm 1,44$ neoplasias/animal *versus* 23 neoplasias; $2,30 \pm 1,42$ neoplasias/animal). A massa e volume das neoplasias foi mais elevada no grupo MNU exercitado (19,10 g e $7,87 \text{ cm}^3 \pm 12,24$ *versus* 13,35 g e $4,88 \text{ cm}^3 \pm 9,86$). A análise histológica revelou que cada massa palpável apresentava diversas lesões histológicas. Todas as lesões foram identificadas e contabilizadas em ambos os grupos expostos à MNU. O número de lesões foi menor no grupo exercitado, quando comparado com o grupo sedentário (71 lesões *versus* 50 lesões) ($p = 0,056$). O número de lesões benignas (30 no grupo sedentário e 26 no grupo exercitado) e pré-neoplásicas (2 no grupo sedentário e 3 no grupo exercitado) foi semelhante entre grupos. O grupo exercitado apresentou menor número de lesões malignas quando comparado com o grupo sedentário (39 *versus* 21 lesões; $p = 0,056$). Todas as lesões dos grupos MNU apresentaram imunopositividade para os recetores de estrogénios (RE)- α and β . A imunomarcagem para os RE- α foi observada no núcleo das células epiteliais luminiais, enquanto a imunomarcagem para os RE- β foi observada no núcleo das componentes epitelial e estromal. Em ambos os grupos MNU, a imunomarcagem para os RE- β foi mais elevada quando comparada com a imunomarcagem para os RE- α ($p < 0,05$). A imunomarcagem para os RE- α foi mais elevada no grupo MNU exercitado, quando comparada com o grupo MNU sedentário ($p < 0,05$). A imunomarcagem para os RE- β foi mais semelhante entre grupos ($p > 0,05$)

(Faustino-Rocha *et al.*, 2016). As neoplasias dos animais exercitados apresentaram maior imunoexpressão do VEGF-A e densidade de microvasos ($p < 0,05$), sugerindo maior vascularização das lesões deste grupo (Faustino-Rocha *et al.*, 2016).

A prática de exercício físico moderado durante um longo período de tempo apresentou efeitos positivos na carcinogénese mamária em ratos: reduziu a inflamação, reduziu o número de lesões mamárias e a sua malignidade. Adicionalmente, a prática de exercício físico aumentou a imunomarcagem dos RE- α , sugerindo uma melhor resposta à terapia hormonal (Faustino-Rocha *et al.*, 2016).

O nosso grupo de investigação desenvolveu um outro projeto com o objetivo de avaliar o efeito do cetotifeno (antihistamínico H1 de segunda geração e estabilizador dos mastócitos) no modelo de cancro da mama induzido pela administração da MNU em ratos Sprague-Dawley do sexo feminino. Trinta e quatro animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais: grupo I (MNU, n=10), grupo II (MNU + cetotifeno-1, n=10), grupo III (MNU + cetotifeno-2, n=10), grupo IV (cetotifeno, n=2) e grupo V (controlo, n=2). Os animais foram mantidos no biotério da UTAD, nas condições anteriormente descritas. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética (aprovação n.º 008961). Às sete semanas de idade, os animais dos grupos MNU receberam uma injeção intraperitoneal do agente carcinogénico MNU (ISOPAC®, Sigma, Espanha), numa dose de 50 mg/kg. Os animais do grupo II receberam o cetotifeno na água de bebida (1 mg/kg) após a administração da MNU, durante 18 semanas. Os animais do grupo III receberam o cetotifeno na água de bebida (1 mg/kg) após o desenvolvimento da primeira neoplasia. A vascularização das neoplasias foi avaliada por ecografia durante o ensaio (modos *Power Doppler*, *B Flow* e contraste) e por imunohistoquímica no final do ensaio (imunomarcagem do VEGF-A). Os animais foram sacrificados às 25 semanas de idade, de

acordo com o método descrito anteriormente. Foi realizada uma necropsia completa.

A primeira neoplasia mamária foi identificada simultaneamente nos grupos expostos à MNU (I, II e III), oito semanas após a administração do agente carcinogénico (Figura 1). Foi observada uma incidência de 60%, 89% e 70% nos grupos I, II e III, respetivamente. No final do ensaio foram contabilizadas 58 neoplasias mamárias: 21 no grupo I (3,5 neoplasias/animal), 19 neoplasias no grupo II (2,4 neoplasias/animal) e 18 neoplasias no grupo III (2,6 neoplasias/animal) ($p > 0,05$). Na análise histológica foram observadas 35 lesões no grupo I (33 das quais malignas), 44 lesões no grupo II (40 das quais malignas) e 48 lesões no grupo III (37 das quais malignas). O grupo II (MNU + cetotifeno-1) apresentou o índice de proliferação (imunoexpressão do Ki-67) mais baixo ($p < 0,05$). Os níveis de histamina foram mais elevados no grupo I (MNU), corroborando a inibição da desgranulação dos mastócitos pelo cetotifeno ($p > 0,05$). A vascularização das neoplasias foi semelhante entre grupos ($p > 0,05$).

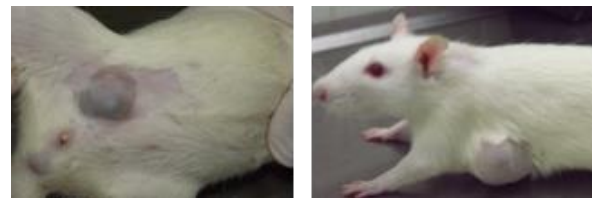


Figura 1 – Neoplasias mamárias desenvolvidas pelos animais durante o protocolo experimental.

O principal efeito positivo da administração do cetotifeno foi a redução da proliferação, quando administrado antes do desenvolvimento das neoplasias (Faustino-Rocha *et al.*, 2017).

5. O RATO (*Rattus norvegicus*) COMO MODELO DE CANCRO DA PRÓSTATA

A próstata é a maior glândula acessória do aparelho reprodutor masculino (Lee *et al.*, 2011). Juntamente com as vesículas seminais e as glândulas bulbouretrais, a próstata é

responsável pela produção do fluido seminal (Bhavsar & Verma, 2014). O cancro da próstata é um dos principais tipos de cancro na população masculina. De acordo com os dados da OMS, o cancro da próstata afetou aproximadamente 1,28 milhões de homens em todo mundo, tendo vitimado 358 989 deles (WHO, 2018).

Considerando o elevado número de mortes associado a este tipo de cancro, o estudo desta doença é de elevada importância para um melhor conhecimento da sua biopatologia e para o desenvolvimento de novas terapias.

O rato é a espécie mais frequentemente utilizada como modelo de cancro da próstata. A próstata do rato é composta por quatro lobos: ventral, lateral, dorsal e anterior, classificados de acordo com a posição dos mesmos relativamente à bexiga (Moore & Melchionna, 1937; Bosland, 1992; Shirai *et al.*, 2000; Shirai, 2007; Nascimento-Gonçalves *et al.*, 2018). O primeiro modelo de cancro da próstata foi descrito por Moore e Melchionna (Moore & Melchionna, 1937), através da administração de 1,2-benzopireno diretamente na próstata do rato. Atualmente encontram-se descritos diversos modelos de cancro da próstata, tais como: espontâneos, quimicamente induzidos, induzidos por hormonas, implantação de células, ou animais geneticamente modificados (Shirai *et al.*, 2000; Shirai, 2007). Devido à elevada incidência de lesões, o modelo de cancro da próstata descrito por Maarten Bosland e induzido pela administração de hormonas e agentes carcinogénicos, é um dos mais usados para o estudo do cancro da próstata (Bosland, 1992). Embora frequentemente utilizado, as várias fases do modelo não se encontram descritas detalhadamente na bibliografia.

O nosso grupo de investigação aplicou o modelo descrito por Bosland em ratos Wistar Unilever e descreveu as várias etapas do mesmo, recorrendo a métodos de imagem como a ecografia, a ressonância magnética e a tomografia computadorizada (Figura 2).

O desenvolvimento de cancro da próstata foi induzido pela aplicação do seguinte protocolo em três ratos machos da estirpe

Wistar Unilever: às 12 semanas de idade, os animais receberam uma injeção subcutânea do fármaco anti-androgénico flutamida (50 mg/kg, TCI Chemicals, EUA), durante 21 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última administração de flutamida, os animais receberam uma injeção subcutânea de propionato de testosterona dissolvido em óleo de milho (100 mg/kg, TCI Chemicals, EUA). Quarente e oito horas após a administração, os animais receberam uma injeção intraperitoneal do agente carcinogénico MNU (30 mg/kg, Isopac[®], Sigma Chemical Co., Spain). Duas semanas mais tarde, foram colocados implantes subcutâneos de testosterona cristalina na região interescapular, durante 44 semanas. Foram usados dois animais como controlo. Os animais foram mantidos no biotério da UTAD, nas condições anteriormente descritas. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética (aprovação n.º 021326).

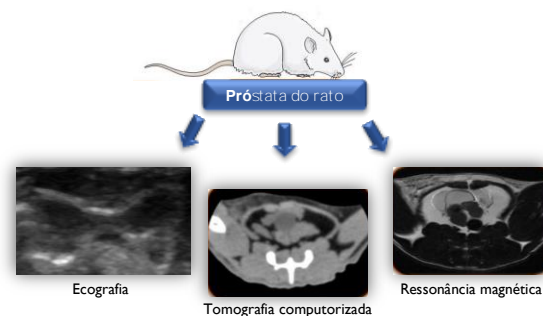


Figura 2 – Avaliação da próstata do rato com diferentes métodos de diagnóstico por imagem.

Durante o ensaio, a próstata foi monitorizada por ecografia (modo B) em diferentes momentos. Para a realização do exame ecográfico, os animais foram colocados em decúbito dorsal, e foi realizada tricotomia da região caudal do abdómen e da região inguinal. O exame ecográfico foi realizado usando o transdutor linear de 12 MHz, do ecógrafo Logiq P6[®] da General Electric (EUA). Foi realizado um varrimento transversal desde a região cranial até à região

caudal do abdómen, e um varrimento longitudinal.

A primeira análise ecográfica foi realizada antes do início do protocolo de indução de cancro da próstata. A próstata apresentava um aspeto semelhante entre os grupos controlo e induzido. A bexiga foi observada no varrimento transversal como uma estrutura anecogénica com forma redonda ou oval. Os lobos ventrais da próstata foram observados como estruturas alongadas hipocogénicas (esquerda e direita), com cápsula hiperecogénica, ventralmente à bexiga. A próstata dorsal foi observada na região do colo da bexiga, como uma estrutura redonda hipocogénica, com uma cápsula hiperecogénica, dorsalmente à bexiga. As vesículas seminais também foram observadas no varrimento transversal. Estas foram observadas como estruturas hipocogénicas alongadas, dorsalmente à bexiga, na transição entre o abdómen cranial e o colo da bexiga. No varrimento longitudinal, a bexiga foi observada como uma estrutura anecogénica alongada. Os lobos ventrais da próstata foram observados ocasionalmente, ventralmente ao colo da bexiga. O lobo dorsal foi observado como uma estrutura hipocogénica redonda ou alongada, com cápsula hiperecogénica, dorsalmente ao colo da bexiga.

Na segunda avaliação ecográfica (após a administração da flutamida), observou-se uma diminuição da dimensão da próstata ventral no grupo induzido. Na terceira avaliação (quatro semanas após a MNU) e na quarta avaliação (17 semanas após a MNU) foi observado um aumento da dimensão da próstata, quando comparada com o exame anterior. A última avaliação foi realizada 46 semanas após a administração da MNU, tendo sido observado um aumento das dimensões da próstata, sendo mais evidente na próstata dorsal. A próstata do grupo controlo foi aumentando gradualmente entre a primeira e a última avaliação ecográfica.

Para a realização da tomografia computadorizada, os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de cetamina (75 mg/kg,

Imalgene[®] 1000, Merial, França) e xilazina (10 mg/kg, Rompun[®] 2%, Bayer, Alemanha). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e o exame foi realizado com o aparelho Brivo CT325 (General Electric Healthcare, EUA). Foi introduzido um cateter de 24G na veia da cauda para a administração do agente de contraste Ultravist 300 (900 mg I/kg, Bayer Healthcare, Alemanha). A bexiga foi observada como uma estrutura circular com menor sinal, quando comparada com a próstata. A administração do agente de contraste não melhorou a visualização da próstata.

O protocolo anestésico anteriormente descrito foi aplicado para a realização da ressonância magnética. O animal foi posicionado em decúbito dorsal e os varrimentos foram realizados com o aparelho GR MRI 3 Tesla (General Electric Healthcare, EUA). A bexiga foi observada como uma estrutura circular, e em volta desta foram observadas a próstata ventral e as vesículas seminais. As vesículas seminais apresentaram menor sinal quando comparadas com a próstata e a bexiga (Ginja *et al.*, 2019).

6. CONCLUSÕES

Os modelos animais desempenham um papel crucial na investigação biomédica. O modelo animal para cada estudo deve ser selecionado considerando o objetivo do estudo, os custos, e as vantagens e desvantagens de cada espécie. Embora não existam modelos ideais, o rato e o murganho têm sido usados como modelos para o estudo de diversas doenças, incluindo o cancro. Os modelos animais permitem não só estudar as várias etapas do processo de carcinogénese, mas também desenvolver e testar novas abordagens terapêuticas, que possam melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevivência dos doentes oncológicos.

REFERÊNCIAS

Badyal, D.K., Desai, C. (2014). Animal use in pharmacology education and research: the changing scenario. *Indian Journal of Pharmacology*, 46(3): 257-265.

- Bartstra, R.W., Bentvelzen, P.A., Zoetelief, J., Mulder, A.H., Broerse, J.J., van Bekkum, D.W. (1998). Induction of mammary tumors in rats by single-dose gamma irradiation at different ages. *Radiation Research*, 150(4): 442.
- Bhavsar, A. & Verma S. (2014). Anatomic imaging of the prostate. *BioMed Research International*, 2014: 1-9.
- Bosland, M.C. (1992). Animal models for the study of prostate carcinogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 16: 89-98.
- Boyland, E. & Sydnor K. (1962). The induction of mammary cancer in rats. *British Journal of Cancer*, 16(4): 731-739.
- Cardiff, R.D. (2007). Epilog: comparative medicine, one medicine and genomic pathology. *Breast Disease*, 28: 107-110.
- Clarke, R. (1996). Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Research and Treatment*, 39(1): 1-6.
- Conn, P.M. (2013). Animal models for the study of human disease animal models for the study of human disease. Elsevier Science & Technology.
- Doctores, A., Martínez, J., Merchán, M.L., Sala, G., Renedo, J., Fernández-Pascual J., *et al.* (1974). Carcinogenesis y nitrosoamidas. *Patología*, 7: 225-230.
- Eickmeyer, S.M., Gamble, G.L., Shahpar, S., Do, K.D. (2012). The role and efficacy of exercise in persons with cancer. *The Journal of Injury, Function and Rehabilitation*, 4(11): 874-881.
- Ericsson, A.C., Crim, M.J., Franklin, C.L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri Medicine* 110(3): 201-205.
- Comissão Europeia. (2013). Sétimo relatório de dados estatísticos sobre o número de animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos nos estados-membros da União Europeia: 1-14.
- Fagundes, D.J. & Taha, M.O. (2004). Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 19(1): 59-65.
- Faustino-Rocha, A.I., Gama, A., Oliveira, P.A., Alvarado, A., Neuparth, M.J., Ferreira, R., *et al.* (2016). Effects of lifelong exercise training on mammary tumorigenesis induced by mnu in female sprague-dawley rats. *Clinical and Experimental Medicine*, 17(2): 151-160.
- Faustino-Rocha, A.I., Silva, A., Gabriel, J., Gil da Costa, R.M., Moutinho, M., Oliveira, P.A., *et al.* (2016). Long-term exercise training as a modulator of mammary cancer vascularization. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81: 273-280.
- Faustino-Rocha, A.I., Ferreira, R., Oliveira, P.A., Gama, A., Ginja, M. (2015). *N*-methyl-*N*-nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. *Tumour Biology*, 36(12): 9095-9117.
- Faustino-Rocha, A.I., Gama, A., Neuparth, M.J., Oliveira, P.A., Ferreira, R., Ginja, M. (2017). Mast cells in mammary carcinogenesis: host or tumor supporters? *Anticancer Research* 37(3): 1013-1021.
- Faustino-Rocha, A.I., Gama, A., Oliveira, P.A., Vanderperren, K., Saunders, J.H., Pires, M.J., *et al.* (2017). Modulation of mammary tumor vascularization by mast cells: ultrasonographic and histopathological approaches. *Life Sciences*, 176: 35-41.
- Forbes, D. (2007). Euroguide: on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. London: Federation of European Laboratory Animal Science Associations.
- Ginja, M., Pires, M.J., Gonzalo-Orden, J.M., Seixas, F., Correia-Cardoso, M., Ferreira, R., *et al.* (2019). Anatomy and imaging of rat prostate: practical monitoring in experimental cancer-induced protocols. *Diagnostics*, 9(3): 68.
- Gulden, W.J.I., Beynen, Hau, J. (1999). Modelos animales. In: Principios de la ciencia del animals de laboratorio (211-219). Granada: Elsevier.
- Hoenerhoff, M.J., Shibata, M.A., Bode, A., Green, J.E.. (2011). Pathologic progression of mammary carcinomas in a C3(1)/SV40 T/t-antigen transgenic rat model of human triple-negative and Her2-positive breast cancer. *Transgenic Research*, 20(2): 247-259.
- Howell, J.S. (1963). Studies on chemically induced breast tumours in the rat. *Acta - Unio Internationalis Contra Cancrum*, 19: 762-764.
- Iannaccone, P. & Jacob H.J. (2009). Rats! *Disease Models & Mechanisms*, 2(5-6): 206-210.
- Ikezaki, S., Takagi, M., Tamura, K. (2011). Natural occurrence of neoplastic lesions in young Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicologic*

Pathology, 24(1): 37-40.

National Cancer Institute. (2019). NCI Dictionary of Cancer Terms. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/animal-model> (November 28, 2019).

Lee, C.H., Akin-Olugbade, O., Kirschenbaum, A. (2011). Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3): 565-575.

Liska, J., Macejova, D., Galbavy, S., Baranova, M., Zlatos, J., Stvrtina, S., *et al.* (2003). Treatment of 1-methyl-1-nitrosourea-induced mammary tumours with immunostimulatory CpG motifs and 13-Cis retinoic acid in female rats: histopathological study. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(2-3): 173-179.

Maeda, K., Ohkura, S., Tsukamura, H. (2000). Physiology of reproduction. In: *The laboratory rat* (145-176). UK: Academic Press.

Mceuen, C.S. (1938). Occurrence of cancer in rats treated with oestrone. *The American Journal of Cancer*, 34: 184-195.

Mcmartin, D.N., Sahota, P.S., Gunson, D.E., Hsu, H.H., Spaet, R.H. (1992). Neoplasms and related proliferative lesions in control Sprague-Dawley rats from carcinogenicity studies - historical data and diagnostic considerations. *Toxicologic Pathology*, 20(2): 212-225.

Moore, R.A. & Melchionna, R.H. (1937). Production of tumors of the prostate of the White rat with 1:2-benzpyrene. *The American Journal of Cancer*, 30(4): 731-741.

Mullins, L.J., Brooker, G., Mullins, J.J. (2002). Transgenesis in the rat. In: *Transgenesis techniques: principles and protocols* (255-270). Cardiff: Humana Press.

Murphy, E.A., Davis, J.M., Barrilleaus, T.L., McClellan, J.L., Steiner, J.L., Carmichael, M.D., *et al.* (2011). Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cytokine*, 55(2): 274-279.

Murray, T.J., Ucci, A.A., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Soto, A.M. 2009. Histological analysis of low dose NMU effects in the rat mammary gland. *BMC Cancer*, 9: 267.

Nascimento-Gonçalves, E., Faustino-Rocha, A.I., Seixas, F., Ginja, M., Colaço, B., Ferreira, R., *et al.* (2018). Modelling human prostate cancer: rat

models. *Life Sciences*, 203: 210-224.

Oishi, Y., Yoshizawa, K., Suzuki, J., Makino, N., Hase, K., Yamauchi, K., *et al.* (1995). Spontaneously occurring mammary adenocarcinoma in a 10-wk-old female rat. *Toxicologic Pathology*, 23(6): 696-700.

Oliveira, P.A., Colaco, A., De la Cruz, P., Lopes, C. (2006). Experimental bladder carcinogenesis-rodent models. *Experimental Oncology*, 28(1): 2-11.

Oliveira, P.A. (2016). Chemical carcinogens. In: *Oxford textbook of oncology*. New York: Oxford University Press.

Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, L.F., Lopes, C. (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(4): 593-616.

Russo, J. & Russo, I.H. (1996). Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Research and Treatment*, 39(1): 7-20.

Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., *et al.* (2000). Experimental prostate carcinogenesis - rodent models. *Mutation Research*, 462(2-3): 219-226.

Shirai, T. (2007). Significance of Chemoprevention for prostate cancer development: experimental in vivo approaches to chemoprevention. *Pathology International*, 58(1): 1-16.

Shull, J.D., Spady, T.J., Snyder, M.C., Johansson, S.L., Pennington, K.L. (1997). Ovary-intact, but not ovariectomized female ACI rats treated with 17-beta-estradiol rapidly develop mammary carcinoma. *Carcinogenesis*, 18(8): 1595-1601.

Siddiqui, I.A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M., Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1348: 20-31.

Smits, B.M., Cotroneo, M.S., Haag, J.D., Gould, M.N. (2007). Genetically engineered rat models for breast cancer. *Breast Disease*, 28: 53-61.

Son, W.C., Bell, D., Taylor, I., Mowat, V. (2010). Profile of early occurring spontaneous tumors in Han Wistar rats. *Toxicologic Pathology*, 38(2): 292-296.

Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., *et al.* (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in

macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 6(8): 3282-3289.

Direção Geral de Alimentação e Veterinária. (2017). Dados estatísticos relativos à utilização de animal para fins experimentais em Portugal. 1-6.

WHO, International Agency for Research on Cancer. (2018). Prostate - Globocan.