



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Marina Gobbe Moschetta

**Avaliação de novos marcadores prognósticos e
preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação
sérica e molecular do VEGF e do HIF-1 α**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas.

São José do Rio Preto
2013

Marina Gobbe Moschetta

**Avaliação de novos marcadores prognósticos e
preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação
sérica e molecular do VEGF e do HIF-1 α**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari

**São José do Rio Preto
2013**

Marina Gobbe Moschetta

**Avaliação de novos marcadores prognósticos e
preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação
sérica e molecular do VEGF e do HIF-1 α**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Debora Ap. P. C. Zuccari

2º Examinador: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

3º Examinador: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

Suplentes: Profa. Dra. MariaTercilia Vilela de Azeredo Oliveira

Profa. Dra. Glória Elisa Florido Mendes

São José do Rio Preto, 16 de setembro de 2013.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP. Apoio financeiro na forma de bolsa de estudos fornecida pela FAPESP e recursos para o desenvolvimento do projeto na forma de Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

Sumário

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos	iv
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas e quadros	xi
Lista de abreviaturas e símbolos	xiii
Resumo	xvii
Abstract	xiv
I. INTRODUÇÃO	2
1. Aspectos Gerais	2
2. Hipóxia	5
3. Angiogênese	7
4. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)	10
5. Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia	13
II. MATERIAL E MÉTODOS	17
Considerações éticas	17
1. Caracterização das amostras	17
2. Processamento das amostras	20
2.1. Obtenção do soro sanguíneo	20
2.2. Obtenção do tecido tumoral	20
2.3. Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas	20
2.3.1. Diagnóstico histopatológico	21
2.3.2. Procedimento imuno-histoquímico	22
2.4. Quantificação da marcação imuno-histoquímica	23
2.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	23
2.5.1. Protocolo ELISA (VEGF)	23
2.5.2. Protocolo ELISA (HIF-1 α)	24
2.6. Técnica de PCR quantitativa	25
2.6.1. Extração de RNA Total	25
2.6.2. Obtenção do cDNA	27
2.6.3. Análise da expressão gênica	28
3. Análise Estatística	30
III. RESULTADOS	33
1. Análise da expressão protéica por imuno-histoquímica	33
2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	37

2.1. Concentração sérica do VEGF	37
2.2. Concentração sérica do HIF-1 α	42
3. PCR em Tempo Real	46
3.1. Quantificação do RNA	46
3.2. Integridade do RNA	47
3.3. Seleção dos genes endógenos	48
3.4. Análise da expressão gênica	50
3.4.1. Expressão gênica do <i>VEGFA</i>	50
3.4.2. Expressão gênica do <i>HIF-1A</i>	53
IV. DISCUSSÃO	56
V. CONCLUSÕES	63
VI. REFERÊNCIAS	65
VII. APÊNDICE	74
VIII. ANEXOS	76

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, que com todo esforço me deu a chance de estudar e ter uma profissão. Agradeço pelo apoio e incentivo durante mais essa caminhada, por me ajudar à tomar sempre a decisão certa e não desistir nunca. Essa conquista também é sua! Você é a pessoa mais importante da minha vida! Te amo!

Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar a vida com saúde e colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

Em especial à minha mãe, Maria, pelas oportunidades que me deu, por tudo que fez a vida toda para que eu pudesse realizar meus sonhos, pelo apoio em todos os momentos e por todas as conquistas que tivemos juntas. Não tenho palavras o suficiente para agradecer por tudo que você fez e faz por mim.

Ao meu pai, Dirceu, pelo pouco tempo que tivemos juntos, mas por tudo que me deixou e pela força que deu à minha mãe mesmo distante. Você está sempre em meu pensamento e também devo à você tudo que sou hoje.

Ao meu irmão, Vinicius, pela convivência, pelas brigas, alegrias e conselhos, e ainda pelos momentos que enfrentamos juntos.

A minha avó Conceição, pelo amor e exemplo de força, pelo carinho e por todos os ensinamentos.

Ao meu namorado, Fernando Pinheiro, por todo amor, carinho, dedicação e companheirismo nessa fase da minha vida. Por estar sempre ao meu lado me apoiando com conselhos e palavras de conforto me dando força e coragem nessa caminhada.

Aos meus tios, tias, primos e primas. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e desejarem o meu sucesso.

A minha grande amiga Daiana C. Prado, por toda a trajetória desde a faculdade até aqui. Pelas horas de estudo, por todos os trabalhos que fizemos juntas e pela linda festa de formatura que organizamos. Obrigada pela amizade sincera e eterna, por desejar meu sucesso e pelos momentos maravilhosos que passamos juntas.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Debora Zuccari, pela oportunidade de iniciar minha carreira científica ainda na Iniciação Científica. Agradeço pelo apoio e pela confiança depositada em mim, e pelos conhecimentos que me fizeram aprender e crescer muito ao longo desses anos.

Aos eternos amigos do laboratório, Larissa B. Maschio, Naiane do N. Gonçalves, Gustavo R. Martins, Lívia C. Ferreira, Juliana R. Lopes, Thaiz F. Borin e Jucimara Colombo pela amizade, companheirismo, pelos momentos de distração e pelo conforto durante minhas angústias. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma neste trabalho, só tenho a agradecer-los por isso, pois sozinha esta etapa da minha vida não teria sido concluída. Agradeço especialmente a Bruna V. Jardim, Gabriela B. Gelaleti e Camila Leonel pelos cinco anos de amizade, pelos ensinamentos, por tudo que enfrentamos juntas e por tudo que fizeram por mim.

Aos amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da Famerp que compartilharam comigo tantos momentos bons e também a Prof^a Dr^a Eny Maria Goloni-Bertollo e a Prof^a Dr^a Erika Cristina Pavarino pela parceria com nosso laboratório.

Aos amigos da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Famerp, Gustavo R. Martins, Glaúcia M. M. Fernandes, Greiciane F. Florim, Camila Mazeti, Cíntia Dias, Marcela Pinhel, Michele Gregório, Vitor R. Regiani, Rodrigo Castro e Tialfi Castro pelos bons momentos compartilhados nas disciplinas e pela amizade.

Ao Sr. Luis O. Bizuti e Prof. Dr. Sidney Pinheiro pela oportunidade da realização de estágio em seu laboratório. Agradeço pelo carinho e pelos ensinamentos.

As minhas amigas Marcela Pinhel, Michele Gregório e Greiciane F. Florim pelo primeiro contato com as técnicas de laboratório, pela oportunidade de publicar meu primeiro artigo e por todos os momentos de alegria que compartilhamos no NPBIM.

A banca examinadora do meu exame geral de qualificação. Agradeço a Prof^a Dr^a Heloisa Helena Caldas pela ajuda durante o desenvolvimento do projeto e pelas sugestões que me permitiram melhorar meu trabalho. A Prof^a Dr^a Dorotéia Rossi da Silva Souza por sua atenção e carinho e pelo acolhimento em seu laboratório logo no início do meu estágio com o Prof. Dr. Sidney Pinheiro.

A Prof^a Dr^a Claudia Regina Bonini-Domingos e a Prof^a Dr^a Erika Crintina Pavarino por aceitarem fazer parte da minha banca de defesa.

Ao Sr. Domingos Zanchetta Netto e ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali pelo auxílio com a histotecnologia e patologia clínica.

Aos médicos veterinários de São José do Rio Preto e Região pela parceria durante o projeto, a ajuda de vocês foi fundamental e de grande aprendizado. E em especial, a todos os proprietários que prontamente permitiram o contato com seus animais tornando possível a pesquisa.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e Auxílio Financeiro concedido, indispensáveis para a realização desse projeto.

A FAMERP pela infra-estrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.

Muito obrigada a todos aqueles que estiveram comigo neste momento...

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1. Representação das etapas envolvidas no processo de formação de novos vasos.....	9
Figura 2. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores.....	11
Figura 3. Processo de angiogênese, iniciado em resposta à situações de hipóxia, com ênfase na via de ativação do VEGF	12
Figura 4. Ativação do HIF α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia).....	14
Figura 5. Fotomicrografia do procedimento imunohistoquímico demonstrando a marcação do anticorpo anti-VEGF em carcinoma mamário de cadela com diagnóstico histopatológico de Carcinoma túbulo-papilar.....	33
Figura 6. Fotomicrografia do procedimento imunohistoquímico demonstrando a marcação do anticorpo anti-HIF-1 α em carcinoma mamário de cadela com diagnóstico histopatológico de Carcinoma túbulo-papilar.....	34
Figura 7. Média da expressão protéica do VEGF e do HIF-1 α nos fragmentos tumorais das cadelas do grupo de estudo.....	34
Figura 8. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em cadelas com neoplasia mamária e grupo controle.....	37
Figura 9. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em tumores com vascularização abundante e moderada.....	38
Figura 10. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em cadelas com neoplasia mamária com e sem metástase.....	38
Figura 11. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em cadelas com neoplasia mamária que continuaram vivas e que vieram à óbito.....	39
Figura 12. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste.....	40
Figura 13. Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de VEGF.....	40
Figura 14. Representação da associação entre a concentração sérica de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle.....	42
Figura 15. Representação da associação entre a concentração sérica de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária com e sem histórico de recidiva tumoral.....	43

Figura 16. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste.....	43
Figura 17. Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de HIF-1 α	44
Figura 18. Padrão eletroforético das subunidades 18S e 28S do RNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	48
Figura 19. Análise realizada pelo Software DataAssist v3.0 mostrando a estabilidade dos genes candidatos à controles endógenos.....	49
Figura 20. Expressão quantitativa do gene <i>VEGFA</i> em tumores mamários de cadelas.....	51
Figura 21. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene <i>VEGFA</i> em tumores mamários de cadelas com irrigação abundante e moderada.....	51
Figura 22. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene <i>VEGFA</i> em cadelas com neoplasia mamária com e sem histórico de recidiva tumoral.....	52
Figura 23. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene <i>VEGFA</i> em cadelas com neoplasia mamária que continuaram vivas e que vieram à óbito.....	52
Figura 24. Expressão quantitativa do gene <i>HIF-1A</i> em tumores mamários de cadelas..	53
Figura 25. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene <i>HIF-1A</i> em tumores mamários de cadelas com irrigação abundante e moderada.....	54
Figura 26. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene <i>HIF-1A</i> em cadelas com neoplasia mamária que continuaram vivas e que vieram à óbito.....	54

Lista de tabelas e quadros

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1. Características clínico-patológicas das cadelas do grupo teste.....	19
Tabela 2. Especificações dos anticorpos primários utilizados para o procedimento imuno-histoquímico.....	23
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos do gene RPS19 utilizados na técnica de PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica relativa.....	29
Tabela 4. Associação entre as características clínico-patológicas e a média da densitometria óptica referente à expressão protéica do VEGF e de HIF-1 α nos grupos estabelecidos.....	36
Tabela 5. Associação entre a concentração sérica de VEGF e os parâmetros clínico-patológicos das cadelas do grupo de estudo.....	41
Tabela 6. Associação entre o percentual sérico de HIF-1 α e os parâmetros clínico-patológicos das cadelas do grupo de estudo.....	45
Tabela 7. Regressão logística multivariada em cadelas com neoplasia mamária e a correlação entre a influência das concentrações do VEGF e HIF-1 α e alguns parâmetros clínico-patológicos com aumento do risco de óbito.....	46
Tabela 8. Quantificação das amostras de RNA extraído pelo método do Trizol.....	47

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas e símbolos

µg	micro-grama
µl	micro-litro
µm	Micrômetros
4-PL	do inglês four parameter logistic
ABB	do inglês Antibody Binding Buffer
AFIP	do inglês Armed Forces Institute of Pathology
BSA	do inglês Bovine Serum Albumin
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CO₂	Fórmula química do gás carbônico
Ct	do inglês Cycle Threshold
CTFB	do inglês Complete Transcription Factor Binding
D.O.M.	Densidade Óptica Média
DAB	Diamino Benzidina
DEPC	do inglês di-etil pirocarbonato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	do inglês Dithiothreitol
EDTA	do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	do inglês Epidermal Growth Factor
ELISA	do inglês Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	Grama
H₂O	Fórmula química da água
H₂O₂	Fórmula química do peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	do inglês Hepatocyte Growth Factor

HIFs	do inglês Hypoxia Inducible Factors
HPRT	do inglês Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
HRP	do inglês horseradish peroxidase
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	do inglês antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
Log10	Logarítimo na base 10
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MMPs	Matriz Metaloproteinases
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
NO	Fórmula química do óxido nítrico
NPBIM	Unidade de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
p53	do inglês tumor protein p53
pb	Pares de base
PBS	do inglês phosphate buffer solution
PCR	do inglês polimerase chain reaction
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIGF	do inglês
PTEN	do inglês Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10
pVHL	do inglês Protein Von Hippel-Lindau
qPCR	do inglês quantitative polimerase chain reaction
rcf	do inglês Relative Centrifugal Force
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossômico

ROC	do inglês receiver operating characteristic
RPL8	do inglês Ribossomal Protein L8
rpm	Rotações por minuto
RPS19	do inglês Ribossomal Protein S19
RPS5	do inglês Ribossomal Protein S5
RQ	do inglês relative quantification
S.E.M.	Desvio Padrão
Tm°	do inglês Temperatura melting
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M=metástase
u.a.	Unidades arbitrárias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
VEGF	do inglês Vascular Endothelial Growth Factor

Resumo

Resumo

Introdução: As neoplasias mamárias são o tipo mais comum de tumor na espécie canina, sendo aproximadamente metade desses tumores de caráter maligno. A hipóxia, caracterizada por níveis de oxigênio abaixo do normal, é um conhecido fator adverso ao tratamento do câncer. O fator de transcrição HIF-1 α é o regulador central da resposta fisiopatológica das células de mamíferos para baixos níveis de oxigênio, capaz de ativar a transcrição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que por sua vez, promove a angiogênese através da sua capacidade de estimular o crescimento, migração e invasão de células endoteliais, contribuindo para o crescimento tumoral. **Objetivos:** Avaliar a concentração sérica e a expressão gênica do VEGF e do HIF-1 α relacionando-os com os parâmetros clínico-patológicos e a sobrevida de cadelas com neoplasia mamária a fim de inferir o possível valor prognóstico desses fatores. **Material e Métodos:** Foram coletados fragmentos tumorais de 30 cadelas com neoplasia mamária para verificar a expressão protéica do VEGF e do HIF-1 α por imuno-histoquímica e a expressão gênica por PCR em Tempo Real. Para determinar a concentração sérica do VEGF e do HIF-1 α pelo método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent), foram coletados soro sanguíneo de 50 cadelas controle (saudáveis) e 30 cadelas com neoplasia mamária (grupo de estudo). Os resultados encontrados foram estatisticamente relacionados às características clínico-patológicas. **Resultados:** A comparação entre a marcação imuno-histoquímica das duas proteínas analisadas demonstrou aumento da intensidade da imunomarcção do VEGF ($p=0,03$). Por meio da técnica de ELISA, foi possível observar relação entre altos níveis séricos de VEGF com vascularização abundante ($p=0,02$), metástase ($p=0,003$), óbito ($p=0,007$) e baixa taxa de sobrevida ($p<0,0001$). Além disso, houve aumento dos níveis séricos de VEGF no grupo de estudo

quando comparados ao grupo controle ($p=0,03$). Ao contrário, o percentual sérico de HIF-1 α das cadelas com neoplasia mamária foi 20% menor do que das cadelas do grupo controle ($p=0,0006$). No entanto, cadelas com histórico de recidiva tumoral demonstraram aumento de 15% no percentual sérico de HIF-1 α ($p=0,03$). Quanto à expressão gênica, houve relação entre o aumento da expressão gênica do *VEGFA* e tumores com vascularização abundante ($p=0,02$), cadelas com histórico de recidiva tumoral ($p=0,01$) e óbito ($p=0,02$). Por outro lado, foi observado aumento estatisticamente significativo da expressão gênica do *HIF-1A* com vascularização moderada ($p=0,01$) e cadelas que continuaram vivas durante o período de acompanhamento ($p=0,003$). **Conclusões:** Nossos resultados demonstram correlação entre o VEGF e as características de pior prognóstico, sugerindo que este fator desempenha um importante papel na progressão tumoral, podendo ser utilizado como um potencial marcador prognóstico na rotina clínica, sendo útil na predição da progressão tumoral em cadelas com neoplasia mamária.

Palavras-chave: Angiogênese, ELISA, Hipóxia, HIF-1 α , qPCR, VEGF, neoplasia mamária canina.

Abstract

Abstract

Introduction: Mammary tumors are the most common type of tumor in dogs, with approximately half of these tumors are malignant. Hypoxia, characterized by oxygen levels below normal, is a known adverse factor to cancer treatment. The transcription factor HIF-1 α is the central regulator of pathophysiological response of mammalian cells to low oxygen levels, able to activate transcription of the vascular endothelial growth factor (VEGF), which in turn promotes angiogenesis through its ability to stimulate growth, migration and invasion of endothelial cells, contributing to tumor growth. **Objectives:** To evaluate the serum concentration and the gene expression of VEGF and HIF-1 α linking them with clinicopathological parameters and survival of dogs with mammary tumors in order to infer the possible prognostic value of these factors. **Material and Methods:** We collected tumor fragments of 30 bitches with mammary tumors to verify protein expression of VEGF and HIF-1 α by immunohistochemistry and gene expression by RT-PCR. To determine the serum concentration of VEGF and HIF-1 α by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent), serum was collected from 50 bitches control (healthy) and 30 bitches with mammary neoplasia (study group). The results were statistically related to clinicopathological features. **Results:** The comparison between immunohistochemical staining of the two proteins analyzed showed increased intensity of immunostaining of VEGF ($p=0.03$). By ELISA, we observed relationship between high serum levels of VEGF and abundant vascularization ($p=0.02$), metastasis ($p=0.003$), death rate ($p=0.007$) and low survival ($p<0.0001$). In addition, increased serum levels of VEGF in the study group compared to the control group ($p=0.03$). In contrast, the percentage of serum HIF-1 α bitches with mammary neoplasia was 20% lower than the control group of female dogs ($p=0.0006$).

However, bitches with a history of recurrent tumor showed a 15% increase in the percentage of serum HIF-1 α (p=0.03). Regarding gene expression, there was a relationship between increased gene expression of *VEGFA* and tumor abundant vascularization (p=0.02), bitches with a history of recurrence (p=0.01) and death (p=0.02). Moreover, we observed a statistically significant increase in gene expression of *HIF-1A* with moderate vascularization (p=0.01) and bitches that remained alive during the follow-up period (p=0.003). **Conclusions:** Our results demonstrate a correlation between VEGF and features of poor prognosis, suggesting that this factor plays an important role in tumor progression and can be used as a potential prognostic marker in clinical practice and is useful in predicting tumor progression in dogs with mammary neoplasia.

Keywords: Angiogenesis, ELISA, Hypoxia, HIF-1 α , qPCR, VEGF, canine mammary neoplasia

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos Gerais

O câncer de mama é uma preocupação mundial, sendo esta, a neoplasia mais comum entre as mulheres e a quinta maior causa de morte relacionada ao câncer. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em todo o mundo. Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) ⁽¹⁾ estimaram a ocorrência de 52.680 novos casos desse tipo tumoral para o ano de 2012, sendo que desses, 12.852 casos evoluíram para óbito.

As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, sendo a capacidade de invasão das células tumorais e conseqüente desenvolvimento de metástases as principais causas de mortalidade em mulheres com câncer de mama e cadelas com tumores mamários malignos. ⁽²⁾ No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres desde 1979. ⁽³⁾ Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos de acompanhamento é de 61% e apesar do progresso no diagnóstico e tratamento nos últimos 30 anos, essa doença é ainda responsável por quase meio milhão de mortes por ano no mundo. ⁽⁴⁾

A espécie canina é a que apresenta a maior incidência de neoplasias mamárias dentre todos os mamíferos e, quando comparada à mulher, apresenta três vezes mais chances de desenvolver essa neoplasia. ⁽⁵⁻⁷⁾ As neoplasias mamárias representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias que acometem cães, sendo 41 a 53% desses tumores de caráter maligno. ⁽⁸⁻¹³⁾

Devido às muitas semelhanças compartilhadas por seres humanos e cães, os tumores mamários em cadelas prestam-se como modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia do câncer ^(11, 14-16), assim como para testes de agentes terapêuticos, já

que animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica e comportamento biológico similares àqueles que acometem os seres humanos, e compartilham uma resposta semelhante à cirurgia e a esquemas de quimioterapia. ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾ Além disso, os tumores de mama em cadelas constituem um desafio para clínicos e, principalmente, para patologistas, uma vez que a nomenclatura e classificação desses tumores têm se revelado muito difíceis e controversas. ^(9, 19)

Um amplo número de fatores são indicadores do prognóstico dos pacientes com câncer de mama, incluindo tipo histológico, tamanho tumoral e comprometimento dos linfonodos. ⁽¹⁰⁾ Na espécie canina, alguns aspectos já estão bem estabelecidos no desenvolvimento da neoplasia mamária: cães de raça têm duas vezes mais chances de desenvolverem tumores mamários. A ausência de receptores de estrógeno e progesterona e o uso de contraceptivos ⁽⁶⁾, além de dieta imprópria e idade avançada aumentam as chances de desenvolver a neoplasia, sendo o problema maior, a negligência dos proprietários, que só levam o animal ao especialista quando o nódulo já tem grande diâmetro, diminuindo as chances de tratamento. ⁽⁹⁾

O conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação da conduta terapêutica. A terapia baseada em uma avaliação prognóstica possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas para cada paciente, assim, a aplicação do conhecimento sobre os fatores prognósticos pode influir favoravelmente na condução do processo terapêutico aumentando a sobrevida do paciente. Anualmente inúmeros estudos científicos são publicados apresentando novos fatores, muitos dos quais promissores. ⁽²⁰⁾

Nesse contexto, o estudo da expressão imuno-histoquímica de marcadores prognósticos e preditivos do câncer de mama tem se revelado importante ferramenta de trabalho. A disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia das neoplasias, oferecendo com isso, uma avaliação mais precisa de prognóstico, diagnóstico e tratamento. ⁽²¹⁻²²⁾ Além disso, pesquisas que verificam características moleculares dos tumores mamários preditivos à resposta terapêutica têm permitido a introdução de tratamentos mais efetivos, o que têm possibilitado o declínio das mortes por câncer de mama e melhorado a qualidade de vida dos pacientes. ⁽²³⁾

Pesquisas recentes demonstram que além dos marcadores imuno-histoquímicos presentes nos tumores, uma crescente variedade de biomarcadores estão sendo identificados, oferecendo a possibilidade de diagnóstico mais detalhado e prognóstico mais confiável. ⁽²⁴⁾

Os biomarcadores são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Essas substâncias são produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo em resposta à presença do tumor e podem ser quantificadas por meios bioquímicos no sangue ou imuno-histoquímicos nos tecidos e por testes genéticos para pesquisas de oncogenes, genes supressores de tumores e alterações genéticas. ⁽²⁵⁾

Uma classe específica de biomarcadores são os sanguíneos, que podem indicar precocemente a presença de células malignas. ⁽²⁶⁾ Ainda, esses marcadores têm vantagens no diagnóstico precoce do câncer, uma vez que refletem a dinâmica dos

estados fisiológicos e patológicos antes da detecção dos sintomas clínicos e não representam um procedimento invasivo. ⁽²⁷⁻²⁸⁾ Dessa forma, podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico e no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. ⁽²⁵⁾

Na medida em que avança a detecção mais precoce dos carcinomas mamários e melhoram os tratamentos para a doença, a busca por uma determinação do prognóstico de cada paciente tem se tornado ainda mais importante. Trabalhos discutindo fatores prognósticos clássicos ou novos abundam na literatura, frequentemente com resultados conflitantes, tornando necessário buscar outros fatores que possam predizer de forma mais acurada o prognóstico. ⁽²⁹⁾

Em cães, a alta incidência e difícil resposta ao tratamento de tumores mamários têm estimulado a busca de novos marcadores para detecção precoce de metástases e melhora do prognóstico ⁽³⁰⁾, sendo o uso de marcadores prognósticos importante para a rotina de diagnóstico e pesquisa na medicina veterinária. ⁽³¹⁾ Dessa forma, embora se trate de um procedimento mais complexo, a avaliação da expressão de um ou mais marcadores prognósticos apresenta-se como ferramenta útil para a prática clínica. ⁽³²⁾

2. Hipóxia

A hipóxia é caracterizada pela redução dos níveis fisiológicos normais de oxigênio nos tecidos, podendo ocorrer durante o desenvolvimento de doença vascular aguda ou crônica, doenças pulmonares e do câncer. ⁽³³⁾ Cerca de 40% dos casos de câncer de mama apresentam uma região de hipóxia no tumor e essa situação tem sido associada ao aumento da taxa de metástase e diminuição na taxa de sobrevivência dos pacientes. ⁽³⁴⁻³⁵⁾

Duas principais condições de hipóxia são conhecidas. A primeira, denominada hipóxia crônica ou difusão-limitada ocorre devido à proliferação descontrolada das células e crescimento rápido do tumor resultando em distâncias longas de difusão de oxigênio do vaso sanguíneo mais próximo ^(33, 36-37), e a segunda, conhecida como hipóxia aguda, é caracterizada pela estrutura caótica dos novos vasos sanguíneos formados resultando na perfusão inadequada em parte do tecido. ^(33, 36, 38)

A hipóxia é tóxica tanto para as células normais quanto para as tumorais, e de acordo com sua gravidade, pode promover apoptose ou pelo contrário, impedir a morte celular, desencadeando uma série de respostas biológicas, levando à proliferação das células e ao crescimento do tumor, contribuindo para um comportamento tumoral mais agressivo. ⁽³⁵⁾ Diferente das células normais, para manter a sobrevivência em situações de hipóxia, as células tumorais têm como característica comum a capacidade de promover alterações em sua funcionalidade, tornando-se resistentes à apoptose, sendo capaz de induzir sua própria vascularização iniciando o processo de angiogênese. ⁽³⁹⁾

Além disso, em condições de hipóxia, essas células iniciam mecanismos adaptativos, como alteração do metabolismo, a produção e liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a ativação de fatores induzidos por hipóxia (HIFs) envolvidos no processo de angiogênese. ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ Dessa forma, a hipóxia desempenha um importante papel na modulação da angiogênese tumoral e está relacionada com o aumento da agressividade tumoral e pior prognóstico dos pacientes. ⁽³⁸⁾

Do ponto de vista clínico, a baixa oxigenação das células tumorais é um conhecido fator prognóstico adverso ao tratamento do câncer, tanto para radioterapia quanto para a quimioterapia. ⁽⁴³⁾ Essa associação tem sido explicada pela redução na

produção de radicais livres por agentes quimioterápicos, como a doxorrubicina, na ausência de oxigênio. Além disso, o estado de oxigenação do tumor pode afetar a citotoxicidade da radiação, portanto, as áreas do tumor deficientes em oxigênio se tornam radorresistentes. ⁽³⁷⁻³⁸⁾

Dessa forma, a identificação dos fatores envolvidos na resposta tumoral à hipóxia é importante para direcionar as estratégias terapêuticas. ⁽³⁸⁾

3. Angiogênese

O crescimento e progressão de tumores assim como o desenvolvimento de metástases, dependem da angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de um endotélio vascular preexistente. ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾

Os vasos sanguíneos são indispensáveis para o desenvolvimento de tumores sólidos, não só para o fornecimento de oxigênio e nutrientes, mas também para a retirada do gás carbônico (CO₂) e dos resíduos metabólicos, além de servirem como um importante caminho para as células malignas migrarem para outros tecidos, possibilitando o desenvolvimento de um tumor secundário. ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾

As células endoteliais e as células de suporte perivascular, os pericitos, são dois tipos distintos de células presentes na parede dos vasos sanguíneos. Na camada interna da parede dos vasos estão localizadas as células endoteliais enquanto os pericitos formam uma camada única de células musculares lisas que ficam em torno das células endoteliais, proporcionando suporte mecânico e estabilidade à parede dos vasos, regulando a função vascular. ^(41, 49-51)

Nesse sentido, a angiogênese desempenha um papel essencial no desenvolvimento do câncer, por esse motivo, tem sido alvo de estudo em diversos tipos de câncer.⁽⁵²⁾

A formação de novos vasos sanguíneos pela angiogênese envolve um número sequencial de passos e se inicia a partir de capilares pré-existentes no tumor (a). Primeiramente, os vasos sanguíneos dilatam e os pericitos se soltam da parede dos vasos (b). Posteriormente, fatores de crescimento pró-angiogênicos produzidos e liberados pelas células tumorais, levam à degradação da matrix extracelular pela sua capacidade de induzir a síntese de enzimas proteolíticas tais como as matriz metaloproteinases (MMPs) permitindo a remodelação do citoesqueleto, aumentando a permeabilidade das células endoteliais (c).⁽⁵³⁻⁵⁵⁾ Em seguida, ocorre a proliferação e migração das células endoteliais e essa proliferação continua até a formação completa dos novos vasos (d). Ao final do processo, ocorre o envelopamento dos novos capilares com estruturas da membrana basal e o recrutamento dos pericitos levando à formação do lúmen (e) (Figura 1).⁽⁵⁶⁾

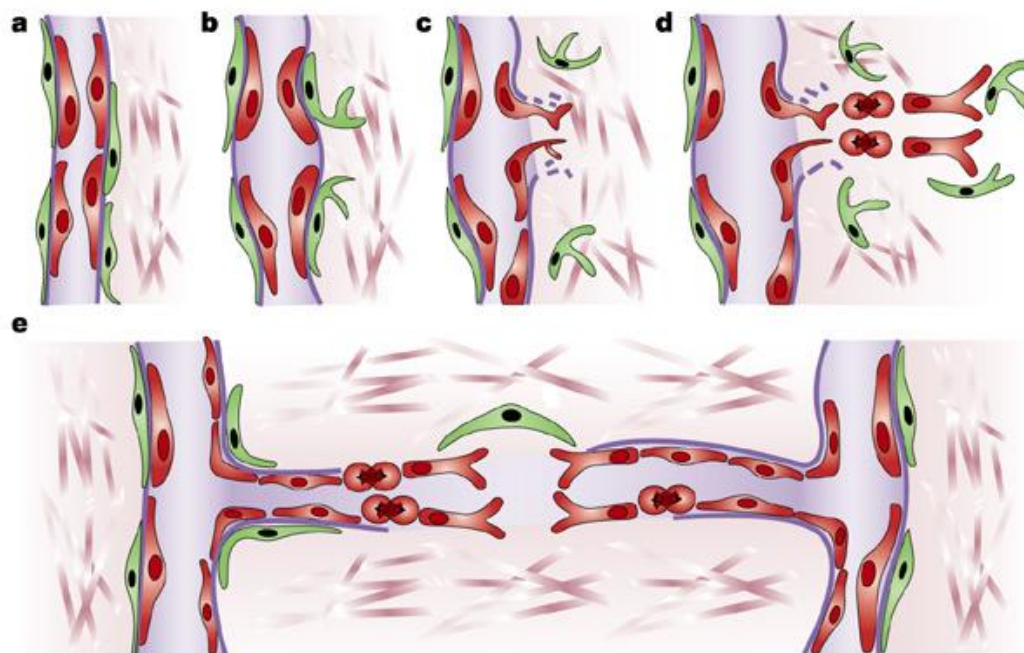


Figura 1. Representação das etapas envolvidas no processo de formação de novos vasos. Adaptado de BERGERS & BENJAMIN, 2003. ⁽⁵⁴⁾

O processo de angiogênese é regulado pelo equilíbrio entre inúmeros fatores pró e anti-angiogênicos ⁽⁵⁷⁾ como o fator de crescimento epidermal (EGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o óxido nítrico (NO). O aumento da expressão do EGF está relacionado ao aumento da expressão do VEGF e indução do processo de angiogênese, assim como o HGF que é um potente mediador desse processo capaz de induzir a produção do VEGF no endotélio vascular e o NO, vasodilator capaz de estimular a formação de novos vasos. ⁽⁵³⁾ Em processos patológicos como no desenvolvimento do câncer, ocorre um desequilíbrio entre esses fatores promovendo alterações no microambiente das células tumorais. ⁽⁵⁸⁾

Dentre os fatores pró-angiogênicos, um dos principais fatores de crescimento específico para o endotélio vascular e mediador do processo de angiogênese é o VEGF.

(57, 59-60)

4. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína ligante à heparina que exerce efeitos múltiplos em tumores, dentre eles, a capacidade de formação de novos vasos sanguíneos, linfáticos e o aumento da permeabilidade vascular. ⁽⁶¹⁾

A família VEGF é composta por cinco isoformas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF). ^(46,62) Cada um desses fatores pode ativar um ou mais dos receptores conhecidos, como VEGFR-1 localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, VEGFR-2 encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR-3 exclusivo do endotélio linfático. ⁽⁶³⁻⁶⁴⁾

O VEGF-A se liga à dois receptores específicos, o VEGFR-1 e o VEGFR-2 enquanto o VEGF-B e PlGF são reconhecidos apenas pelo receptor VEGFR-1. O VEGF-C e VEGF-D se ligam ao VEGFR-2 e também são reconhecidos pelo VEGFR-3 (Figura 2). ⁽⁶⁵⁾ O VEGF-A e o VEGF-B são os mais importantes reguladores do processo de angiogênese, enquanto o VEGF-C e VEGF-D estão especificamente envolvidos na linfoangiogênese. ^(62,66)

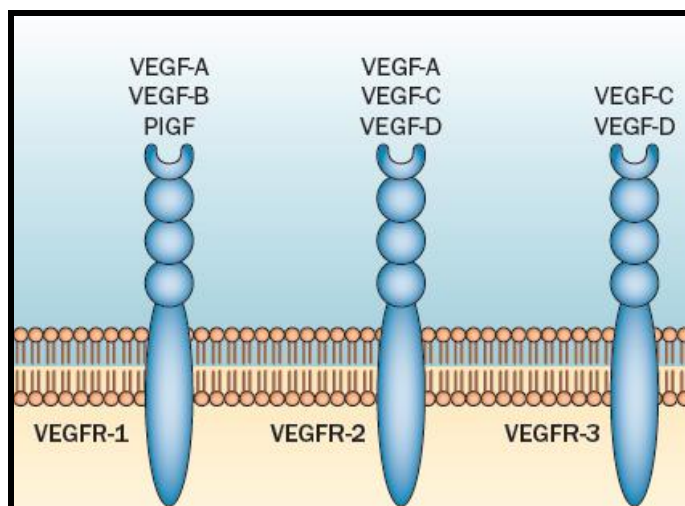


Figura 2. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores. Adaptado de TAIMEH et al., 2013. ⁽⁶⁷⁾

O VEGF tem sido considerado o principal mediador do processo de angiogênese no câncer de mama. ⁽⁶⁴⁾ O VEGF-A, um dos maiores reguladores do processo de angiogênese, foi detectado inicialmente em linhagens de células tumorais, enquanto os seus receptores VEGFR-1 e VEGFR-2 foram predominantemente expressos em células endoteliais. ⁽⁶⁸⁾

A ligação entre o VEGF-A e o VEGFR-2 está associada à proliferação das células tumorais, sendo a ativação do VEGFR-2 considerada o mais importante passo do processo de angiogênese. ⁽⁴⁵⁻⁶⁹⁾

Todas as principais isoformas de VEGF tem sido identificadas em cães, sendo os seus receptores também idênticos em humanos. A expressão do VEGF em tumores caninos é similar ao observado em neoplasias humanas, entretanto, na oncologia veterinária, o papel da angiogênese e sua correlação com o comportamento biológico dos tumores mamários é ainda pouco documentada. ⁽⁶⁶⁾

O VEGF-A é produzido pelas células tumorais em situações de hipóxia e quando liberado se liga ao receptor VEGFR-2 localizado na membrana das células endoteliais,

promovendo a angiogênese através da sua capacidade de estimular o crescimento, migração e invasão de células endoteliais ^(63, 70-72) contribuindo para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (Figura 3). ⁽⁴⁰⁾

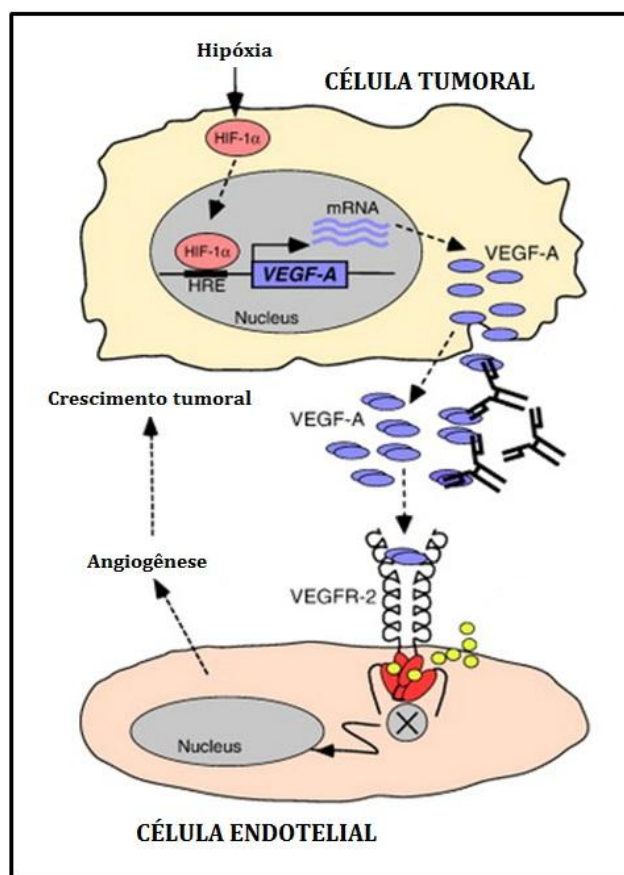


Figura 3. Processo de angiogênese, iniciado em resposta à situações de hipóxia, com ênfase na via de ativação do VEGF. Adaptado de HOLMES et al., 2007. ⁽⁷³⁾

O grau de progressão do tumor tais como o crescimento, aumento da densidade microvascular e desenvolvimento de metástases se correlacionam diretamente com a expressão do VEGF. ⁽⁷⁰⁻⁷¹⁾ Atualmente, o aumento da expressão do VEGF em tumores mamários de mulheres e cadelas tem sido relacionado com comportamento tumoral agressivo e pior prognóstico. ⁽⁷⁴⁻⁷⁵⁾

Nesse sentido, o desenvolvimento de terapias que tem como alvo inibir o VEGF têm se mostrado eficazes em bloquear o processo de angiogênese, diminuindo o crescimento do tumor. ^(68, 74,76-77)

5. Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia

A expressão do VEGF nas células do câncer está sob o controle do fator induzível por hipóxia - 1 (HIF-1), que é um fator de transcrição induzido sob hipóxia e que nestas condições, migra desde o citoplasma para o núcleo das células, ligando-se à elementos de resposta à hipóxia, conduzindo à expressão de genes, principalmente o VEGF. ^(40, 62, 78)

O HIF-1 desempenha um papel importante no crescimento normal e desenvolvimento da isquemia, inflamação e do câncer ^(44, 79-80) Além disso, o HIF-1 é um importante modulador da resposta intracelular a microambientes em hipóxia, funcionando como fator de transcrição de genes, sendo o aumento de sua expressão capaz de promover angiogênese. ^(42, 81)

Os HIFs são essenciais na manutenção da homeostase do oxigênio nos organismos e desencadeados de respostas adaptativas à redução nos níveis de oxigênio. Os HIFs são compostos por duas subunidades HIF α e HIF β . Em mamíferos a subunidade HIF α é codificada por três genes: HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α . ^(41, 82) As subunidades HIF-2 α e HIF-3 β são expressas em diversos tecidos, incluindo rins, cérebro, pulmões e coração, enquanto o subtipo 1 α apresenta importância funcional especificamente em tumores de mama. ⁽⁸³⁾

Em situações normais de oxigênio, o HIF α é reconhecido pela proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL), ubiquitinilado e ao final sofre

degradação proteossomal. No entanto, em situações de hipóxia, o pVHL se liga ao NO e o HIF α não é reconhecido. Nesse caso, o HIF α é ativado e induz a expressão de genes de resposta à hipóxia, como o VEGF, que por sua vez estimula o processo de angiogênese (Figura 4).^(59, 83-85)

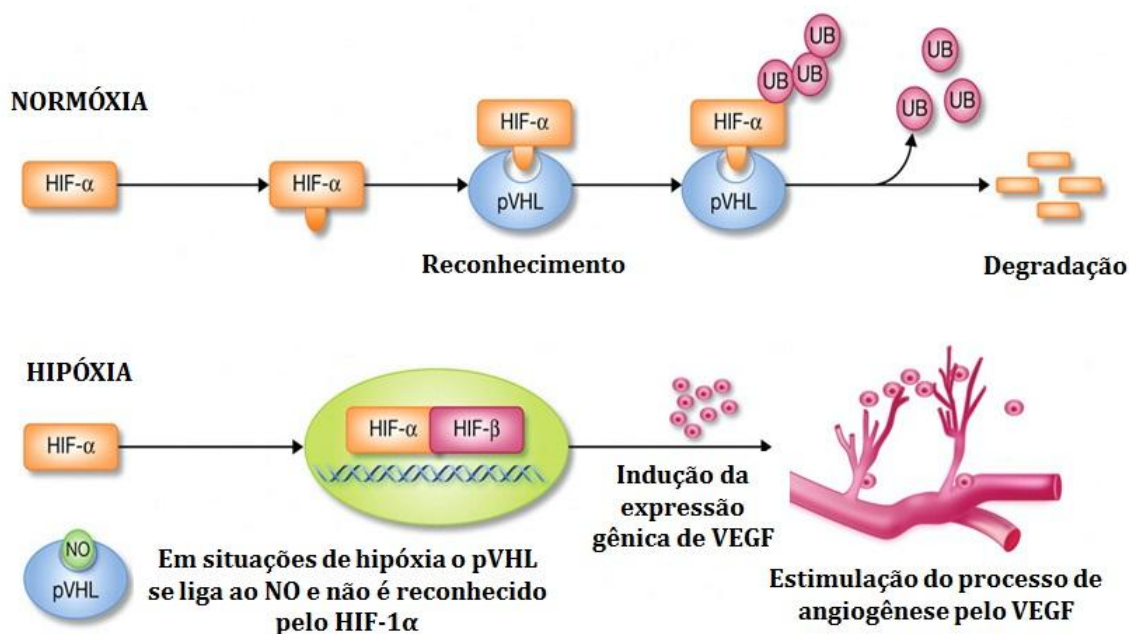


Figura 4. Ativação do HIF α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia). Adaptado de RAHIMI, 2012.⁽⁶⁵⁾

A superexpressão do HIF-1 tem sido correlacionada com pior prognóstico das pacientes com câncer de mama, implicando na resistência ao tratamento.^(80, 86)

Assim, a superexpressão do VEGF e/ou do HIF-1 α resulta no aumento da angiogênese associando-se com a progressão maligna e com o aumento do potencial invasivo e metastático das células tumorais.^(35, 64, 70-71, 86-88)

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo verificar o valor prognóstico do VEGF e do HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária, relacionando-os com os

parâmetros clínico-patológicos, a evolução clínica e sobrevida. Desse modo, os objetivos específicos foram:

- Verificar os níveis séricos de VEGF e HIF-1 α de 30 cadelas com neoplasia mamária, em quatro diferentes momentos após o diagnóstico da doença.
- Analisar a expressão protéica e gênica do VEGF e do HIF-1 α em 30 fragmentos tumorais de mama de cadelas.

Material e Métodos

II. MATERIAL E MÉTODOS

Considerações éticas

O presente estudo não acarretou riscos físicos à saúde das cadelas selecionadas, uma vez que foram utilizados fragmentos tumorais de descarte do exame histopatológico. Os proprietários foram informados dos objetivos da pesquisa, bem como das coletas sanguíneas subsequentes e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo A). O médico veterinário responsável preencheu a ficha clínica do animal (Anexo B) e os dados foram plotados em tabela para posterior análise. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (Protocolo nº 5230/2010) (Anexo C).

1. Caracterização das amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 30 cadelas com neoplasia mamária (grupo de estudo) e 50 cadelas hígdas (grupo controle), atendidas nas clínicas veterinárias de São José do Rio Preto e região durante os anos de 2011 e 2012. As coletas de sangue foram realizadas no momento da excisão cirúrgica do tumor, um mês, seis meses e um ano após a cirurgia. Os critérios de exclusão para as cadelas do grupo controle foram rigorosamente seguidos, sendo incluídas no grupo apenas cadelas sem histórico de doença e procedimento cirúrgico em período próximo. Além disso, foram coletados também do grupo de estudo, 30 fragmentos tumorais e seis fragmentos sem acometimento tumoral para a realização das técnicas de imuno-histoquímica, PCR quantitativo (qPCR) e diagnóstico histopatológico.

As cadelas do grupo de estudo foram avaliadas com relação às características clínico-patológicas (tempo de evolução tumoral – período relacionado ao aparecimento

tumoral até a excisão cirúrgica, número de nódulos, tamanho tumoral, grau histológico, status linfonodal, estadiamento clínico, ulceração e vascularização) e com a evolução clínica (ocorrência de metástase, recidiva local e óbito). A ocorrência de metástase, assim como a data e causa da morte foram descritas pelo veterinário, sendo que neste grupo, apenas cadelas que morreram pela doença foram incluídas.

A idade dos animais variou de 7 a 14 anos, sendo a média do diagnóstico de 10 anos. Dos 30 fragmentos tumorais coletados e histopatologicamente diagnosticados, a maioria dos tumores foi classificada como maligno (80%), sendo de predominância os Carcinomas túbulo-papilares (67%). Dentre as características clínico-patológicas, foi predominante o tempo de evolução maior que 6 meses (43%), sendo 50% dos tumores de localização em cadeia múltipla; tamanho tumoral T1 (menores que 3 cm) (60%) e estadiamento clínico I (50%). Quanto à vascularização tumoral, 27% dos tumores apresentaram vascularização abundante e 13% ulceração. A taxa de recidiva local foi de 20%, metástase 20% e a taxa de óbito de 27% (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínico-patológicas das cadelas do grupo teste.

	Tempo de evolução (meses)	Exame histopatológico	Nº de nódulos	TNM	Estadiamento	Metástase	Recidiva	Ulceração	Vascularização	Censura	Seguimento (dias)
C1	mais de 6	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T3/N0/M0	III	não	não	sim	abundante	Viva	365
C2	mais de 6	Carcinoma em tumor misto	único	T3/N0/M0	III	não	sim	não	moderada	Viva	365
C3	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	único	T3/N1a/M0	III	não	não	sim	abundante	Óbito	30
C4	até 6	Carcinoma sólido	único	T1/N1/M1	IV	sim	não	não	abundante	Óbito	30
C5	1 mês	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C6	até 6	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C7	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T1/N0/M0	I	não	não	sim	abundante	Óbito	30
C8	até 6	Tumor misto benigno	único	T1/N1/M1	IV	sim	sim	não	moderada	Viva	365
C9	até 6	Carcinoma em tumor misto	múltiplos	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C10	1 mês	Tumor misto benigno	múltiplos	T1/N2a/M0	I	não	sim	não	moderada	Viva	365
C11	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T2/N2/M1	III	sim	sim	não	abundante	Óbito	30
C12	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	único	T1/N1/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C13	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T1/N1/M1	IV	sim	não	não	moderada	Óbito	180
C14	até 6	Carcinossarcoma	único	T3/N0/M1	IV	sim	sim	não	moderada	Óbito	180
C15	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	único	T2/N0/M0	II	não	não	sim	moderada	Viva	365
C16	1 mês	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C17	1 mês	Tumor misto benigno	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C18	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C19	1 mês	Carcinoma túbulo-papilar	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C20	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T3/N0/M0	III	não	não	não	moderada	Viva	365
C21	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T2/N0/M0	II	não	sim	não	abundante	Viva	365
C22	1 mês	Adenoma	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C23	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C24	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T3/N2/M0	IV	não	não	não	moderada	Viva	365
C25	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T3/N0/M0	III	não	não	não	abundante	Viva	365
C26	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	múltiplos	T2/N1/M1	IV	sim	não	não	moderada	Óbito	365
C27	1 mês	Carcinoma túbulo-papilar	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C28	mais de 6	Carcinoma in situ	múltiplos	T3/N1/Mx	III	não	não	não	abundante	Óbito	30
C29	mais de 6	Tumor misto benigno	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365
C30	mais de 6	Tumor misto benigno	único	T1/N0/M0	I	não	não	não	moderada	Viva	365

2. Processamento das amostras

2.1. Obtenção do soro sanguíneo

Foram coletados 3 mL de sangue em tubo (Vacutainer) contendo gel separador (filtro 13-mm), em quatro momentos diferentes: no momento da cirurgia, um mês, seis meses e um ano após a cirurgia. As amostras de sangue foram incubadas em banho-maria a 37°C por 20 minutos e centrifugadas por 25 minutos a 1000 G. O soro foi armazenado em tubos eppendorfs identificados e estocado em freezer a -80°C para posterior realização do teste de ELISA.

2.2. Obtenção do tecido tumoral

Durante a exérese tumoral, foram coletados dois fragmentos tumorais de pelo menos três centímetros de diâmetro, armazenados em temperatura ambiente, em tubos tipo falcon de polipropileno de 15 e 50 mL estéreis: um contendo formol 10%, para posterior preparação histopatológica e visibilização em Hematoxilina-Eosina (HE) e outro contendo solução estabilizadora de RNA - RNAlater (Life Technologies®) para realização da técnica de qPCR.

2.3. Preparação dos fragmentos tumorais e confecção das lâminas

O fragmento tumoral armazenado em tubo de polipropileno tipo falcon de 50 ml contendo formol 10% foi incluído em parafina para posterior corte histológico em micrótomo e coloração pelo método de HE para avaliação histopatológica. O procedimento de preparo das lâminas permanentes envolveu as seguintes etapas: Fixação: O fragmento tumoral foi colocado em formol 10% por 24 horas seguido de álcool 70%; Inclusão: o material foi colocado em cassetes devidamente identificados,

passando pelas seguintes etapas: Desidratação em álcool etílico absoluto com aumento progressivo da concentração para a retirada da água do interior da célula, diafanização em xilol e impregnação em parafina.

Em seguida, o material emblocado em parafina foi preso ao micrótomo, a espessura do corte foi regulada para 3 µm e os cortes colocados em lâmina previamente sinalizada e identificada, deixados na estufa a 60°C por 24 horas.

2.3.1. Diagnóstico histopatológico

Para o diagnóstico histopatológico, os cortes histológicos foram corados com HE seguindo os procedimentos histológicos padrões: desparafinização em xilol, seguida por hidratação em álcool absoluto I, II e III finalizando com 6 mergulhos em água corrente. Para a coloração de núcleo as lâminas permaneceram em um corante básico denominado hematoxilina por 4 a 6 minutos e foram lavadas em água corrente (6 mergulhos). Em seguida as lâminas foram mergulhadas rapidamente em álcool 70%, lavadas com água corrente por 10 minutos e submetidas a 6 mergulhos em álcool 80%. Para a coloração de citoplasma as lâminas permaneceram 30 segundos em um corante ácido denominado Eosina. Em seguida o tecido foi desidratado em álcool 95% (6 mergulhos) e álcool absoluto I e II (6 mergulhos em cada) e clarificados em Xilol I, II e III (6 mergulhos em cada) finalizando com a montagem das lâminas.

O diagnóstico histopatológico classificado de acordo com Misdorp⁽⁸⁹⁾ pela AFIP (Armed Forces Institute of Pathology) e os parâmetros usados para estadiamento clínico estão de acordo com o sistema TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase)⁽⁹⁰⁾ estabelecido pela OMS para tumores mamários caninos.⁽⁹¹⁾ Foi estabelecido o tamanho tumoral (T) - T1: < 3cm - T2: entre 3 e 5cm - T3: > 5cm; o envolvimento linfonodal (N) - N0: sem envolvimento aparente - N1: envolvimento unilateral - N2: envolvimento

bilateral e presença de metástase à distância (M) - M0: sem metástases evidentes - M1: metástase à distância incluindo linfonodos não regionais, sendo classificados como I, II, III ou IV de acordo com a extensão tumoral e estabelecimento do prognóstico.

2.3.2. Procedimento imuno-histoquímico

Para o desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica, os cortes histológicos dos fragmentos tumorais emblocados em parafina foram desparafinizados em xilol, rehidratados em álcool em grau decrescente e incubados em 3% de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena.

A recuperação antigênica foi realizada na panela a vapor com tampão específico para cada anticorpo por 35 minutos (Tabela 2), em seguida as lâminas foram encobertas com solução contendo soro fetal bovino (BSA)¹ por 30 minutos e incubadas com o anticorpo primário “*overnight*” (Tabela 2).

Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS² por 15 minutos e incubadas com anticorpo secundário biotilado por 20 minutos e complexo estreptavidina peroxidase por 10 minutos (Kit STARR TREK Universal HRP Detection – Medical Biocare®), seguido de lavagem com PBS por 15 minutos. A revelação foi feita com substrato cromógeno DAB (Signet Laboratories®) de 2 a 5 minutos e a contra-coloração com Hematoxilina de Harrys por 40 segundos. Os tecidos foram desidratados em álcool em grau crescente e banhados no xilol antes da montagem das lâminas em meio Ery-mount (Erviegas®).

^{1,2} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

Os controles negativos das reações foram obtidos com omissão do anticorpo primário e os tecidos de rim e tumor de mama humano foram utilizados como controle positivo das reações de acordo com instruções dos fabricantes dos anticorpos primários.

Tabela 2. Especificações dos anticorpos primários utilizados para o procedimento imuno-histoquímico.

Anticorpo	Especificidade	Diluição	Tampão	Marca
VEFG	Policlonal (rabbit)	1:500	Citrato pH6 ³	Santa Cruz
HIF-1 α	Monoclonal (mouse)	1:50	Citrato pH6	Santa Cruz

2.4. Quantificação da marcação imuno-histoquímica

A imunomarcação do VEGF e do HIF-1 α foi quantificada por densitometria óptica. As lâminas foram fotografadas e analisadas ao microscópio Nikon Eclipse E200 em objetiva de 40X e as proteínas foram quantificadas pelo analisador de imagens (software ImageJ). Para cada lâmina foram fotografadas três diferentes áreas e em cada área foram marcados 20 pontos, totalizando 60 pontos por lâmina para obter uma média relacionada com a intensidade de imunorreatividade. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (u.a.) e a densidade óptica média (D.O.M.) mostrou a intensidade de imunomarcação apenas nas áreas imunoreativas.

2.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

2.5.1. Protocolo ELISA (VEGF)

A quantificação da proteína VEGF foi determinada pelo Kit ELISA Quantikine Canine VEGF CAVE00 (R&D Systems®). A microplaca de poliestireno de 96 poços

³ Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

foi pré-revestida pelo fabricante com anticorpo de captura específico *anti-VEGF* (monoclonal *mouse anti-canine VEGF*). Foram adicionados 100 µL de reagente diluente RD1W em cada poço, 100 µL das amostras e do anticorpo padrão em diluições seriadas de 2500 – 1250 – 625 – 313 – 156 – 78,1 – 39,10 pg/mL nos respectivos poços. Após incubação com filme plástico por 2 horas em temperatura ambiente, foram realizadas 3 lavagens com 300 uL de solução de lavagem (20 mL de tampão de lavagem concentrado diluído em 480 mL de água destilada). Em seguida, foram adicionados 200 µL do anticorpo de detecção (policlonal *anti-canine VEGF*) e incubado com filme plástico por 2 horas. Mais uma vez a placa foi lavada e então foram adicionados 200 uL de solução com substrato cromógeno resultante da mistura do reagente de cor A (H₂O₂ - R&D Systems®) e B (Tetramethylbenzidine - R&D Systems®) e a placa coberta com papel alumínio por 25 minutos em temperatura ambiente, para dar início a reação enzimática e ao desenvolvimento da coloração se o antígeno estiver presente. Ao final, foram adicionados 50 uL de solução de parada (2N H₂SO₄) para cessar a reação. As amostras foram quantificadas pelo leitor de ELISA (filtro = 450 nm) (ThermoPlate®).

O cálculo das densidades ópticas foi estabelecido através da curva de ajuste *four parameter logistic* (4-PL) pelo software SkanIt for Multiskan FC 2.5.1.

2.5.2. Protocolo ELISA (HIF-1α)

A quantificação da proteína HIF-1α foi determinada pelo Kit ELISA Fator de Transcrição HIF-1α KA1321 Quantikine (R&D Systems®). No primeiro dia da reação foram acrescentados 90 µl de *Complete Transcription Factor Binding* (CTFB⁴), 10 µl do Controle Positivo do Fator de Transcrição HIF-1α e amostras nos respectivos poços

⁴Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

da microplaca de poliestireno. A placa foi coberta com filme plástico e incubada à 4°C “*overnight*” (no mínimo 12 horas). No segundo dia, foram realizadas 5 lavagens com 200 µl de solução de lavagem⁵. Em seguida, foram adicionados 100 µl de anticorpo primário *anti-HIF-1α* já diluído (1:100 em 1X ABB⁶); a placa foi coberta com adesivo plástico e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Após o período de incubação, novamente a placa foi lavada e foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário conjugado *goat anti-rabbit HIF-1α* diluído (1:100 em 1X ABB); a placa foi coberta com adesivo plástico e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Mais uma vez a placa foi lavada e então foram adicionados 100 µl de solução substrato cromógeno e a placa coberta com papel alumínio, protegida da luz, por 45 minutos em temperatura ambiente. Ao final, foram adicionados 100 µl de solução de parada (2N H₂SO₄) em cada poço para cessar a reação enzimática. As amostras foram quantificadas pelo leitor de ELISA (filtro = 450 nm) (ThermoPlate®). A unidade de medida da concentração é dada em porcentagem com relação às amostras controle.

2.6. Técnica de PCR quantitativa

2.6.1. Extração de RNA Total

O RNA total foi extraído dos 30 fragmentos tumorais e seis fragmentos sem acometimento tumoral, utilizados como controle, seguindo o protocolo que acompanha o reagente Trizol (Invitrogen®).

Inicialmente, os fragmentos tumorais foram armazenados em tubos falcon de polipropileno de 15 mL contendo solução estabilizadora de RNA – RNAlater. Em seguida, foram cortados manualmente com o auxílio de uma navalha no tamanho de 100

^{5,6} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

mg e inseridos em tubo falcon de polipropileno de 50 mL já contendo 1 mL do reagente Trizol. Os fragmentos foram triturados com auxílio do macerador (Politron®) e mais 1 mL de Trizol foi adicionado ao tubo, resultando em 2 mL do reagente Trizol para cada 100 mg de fragmento tumoral triturado, sendo dividido em 2 tubos eppendorfs de polipropileno (1 mL em cada tubo). Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol, homogeneizando por inversão e mantendo à temperatura ambiente por 3 minutos.

Os tubos foram centrifugados a 14.000 rcf por 20 minutos a 4° C, resultando em uma fase vermelha inferior – fase fenol-clorofórmio – uma interfase, e uma fase aquosa superior, na qual o RNA se concentra. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 400 µL de álcool isopropílico para precipitação do RNA, seguido de incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 14.000 rcf por 20 minutos à 4° C formando um pellet de RNA, que foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugado novamente a 7.500 rcf por 7 minutos à 4° C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados sobre papel absorvente até secar o *pellet*. Após esta etapa, adicionou-se 30 µL de água DEPC (di-etil pirocarbonato) (Invitrogen®) para diluir o *pellet*. A concentração dos RNAs foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific®) na absorbância de 260nm e 280nm. Ao final, as soluções de RNA foram armazenadas a -80° C.

Para testar a integridade e qualidade do RNA extraído, uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para análise das bandas específicas das subunidades 18S e 28S, representativas do RNAr. O RNA total foi então

utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

2.6.2. Obtenção do cDNA

A síntese de cDNA, foi realizada a partir de 2 µg de RNA total seguindo as especificações dos fabricantes do Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems®). Anteriormente ao uso do Kit as amostras foram tratadas com DNase para eliminar qualquer possível resquício de DNA. Em cada tubo acrescentou-se 2 µL de DNase, 2 µL de *Buffer* 10X, levando ao termociclador a 25°C por 15 minutos. Acrescentou-se 2µL de EDTA (*stop solution*) e levando ao termociclador novamente a 65°C por 10 minutos.

Após, seguiu-se o uso do kit High Capacity cDNA, calculando a quantidade dos reagentes conforme o número de amostras, sempre incluindo o volume referente à perdas que podem ocorrer durante a transferência dos reagentes.

O mix foi preparado no volume final de 20 µL por amostra de RNA. Foram misturados 0,8 µL de dNTP, 2 µL de Random Primer, 2 µL de Buffer, 1 µL da enzima Multicribe Reverse Transcriptase e 4,2 µL de água DEPC e 10 µL de amostra de RNA na concentração de 2 µg. Em seguida, a solução final foi colocada no termociclador, a reação apresentou uma etapa inicial de 25° C por 10 minutos, 37° C por 120 minutos e foi finalizada a 85° C por 5 minutos. Por fim, as amostras foram armazenadas em freezer a -20° C.

2.6.3. Análise da expressão gênica

Um fator importante a ser considerado em experimentos de PCR quantitativo é a eficiência de amplificação do gene de interesse e dos genes normalizadores, em função da concentração de RNA utilizado através da “curva padrão relativa”. Para esta verificação, foram realizadas diluições seriadas de cDNA, sendo testadas as concentrações de 100 ng/μL; 10 ng/μL; 1 ng/μL; 0,1 ng/μL; 0,01 ng/μL submetidas à amplificação por qPCR.

O resultado da validação da eficiência é dado por um valor chamado *slope*, que corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do C_t (*Cycle threshold*) dos genes em função do Log de diferentes quantidades de cDNA. O C_t é o momento no qual o sistema de amplificação começa a detectar um aumento no sinal associado ao aumento exponencial do produto de PCR na fase linear da reação.

Os valores do *slope* foram padronizados refletindo uma eficiência de amplificação entre 95% e 105%. A eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para os genes de interesse e normalizadores foram calculadas de acordo com a equação: $E=10^{(-1/slope)}$.

A reação de qPCR foi realizada pelo sistema StepOne Plus Real Time PCR (Applied Biosystems®) e TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems®), utilizando-se os iniciadores específicos para os genes *VEGFA* e *HIF1A*. Foram testados quatro genes candidatos à normalizadores da reação: *RPS19* (*Ribosomal Protein S19*), *RPL8* (*Ribosomal Protein L8*), *HPRT* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*) e *RPS5* (*Ribosomal Protein S5*). A seleção dos genes endógenos foi feita com auxílio do software DataAssist v3.0 (Applied Biosystems®).

As sequências dos *primers* e *probe* do gene *RPS19* utilizado como controle endógeno foram desenhadas com auxílio do software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems®) considerando o tamanho do produto esperado (aproximadamente 80pb a 140pb), o conteúdo em dinucleotídeos GC (~60%), a temperatura de anelamento dos *primers* ($T_m^\circ = 60^\circ\text{C}$) e da *probe* ($T_m^\circ = 70^\circ\text{C}$) e a ausência de homologia com seqüências repetitivas no genoma. A Tabela 3 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores do gene *RPS19*. Para os outros genes, os ensaios utilizados foram: *HIF1A* (Cf02741632_m1), *VEGFA* (Cf02623449_m1) e *RPL8* (Cf02663820_m1).

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos do gene *RPS19* utilizados na técnica de PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica relativa.

Gene	Sequência
RPS19	Sense 5'- GCC TTC CTC AAA AAG TCT GGG - 3'
	Antisense 5'- GTT CTC ATC GTA GGG AGC AAG C - 3'
	Probe 5'- 6FAM-CCC TGA ATG GGT GGA C-MGB - 3'

Após as etapas de padronização, foram realizadas as análises para verificar a expressão diferencial dos genes *HIF1A* e *VEGF*. As amostras foram testadas em triplicatas e, em todos os experimentos houve controle negativo e um *pool* de amostras normais foi escolhido para calibração da reação.

O mix de cada gene foi preparado adicionando-se 10 μL de TaqMan Universal Master Mix, 1 μL de TaqMan Gene Expression e 8 μL de água DEPC. Em seguida, 19 μL da solução final foram transferidos para cada poço de uma placa de 96 poços de poliestireno e adicionou-se 1 μL da amostra de cDNA (100 ng) nos respectivos poços, homogeneizando a solução. A placa foi coberta com um adesivo próprio e centrifugada a 3.700 rpm por 1 minuto à 25°C . As condições do qPCR compreenderam uma etapa

inicial de 2 minutos a 50°C, desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias e 35 segundos a 65°C para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 segundos a 95°C seguido de 1 minuto a 60°C.

Dessa forma, a partir dos valores do C_t de cada amostra, foi calculado o valor da expressão relativa dos genes de interesse pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ($\Delta\Delta C_t$).⁽⁹²⁾ Posteriormente, foi calculado o ΔC_t a partir da subtração da média obtida para a sequência de interesse por aquela do controle endógeno. Para o cálculo do $\Delta-\Delta C_t$, foram escolhidas as amostras normais (controle) como calibrador, sendo atribuído a mesma o valor de zero como resultado da subtração de seu próprio ΔC_t .

Nas amostras tumorais, o resultado do $\Delta-\Delta C_t$ foi calculado a partir das diferenças dos valores de ΔC_t de cada um deles em relação ao calibrador. Em seguida, foi calculado o $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Finalmente, para uma melhor representação gráfica, os resultados foram apresentados em uma escala logarítmica de base 10 (Log_{10}).

3. Análise Estatística

Para avaliar o valor prognóstico e preditivo do VEGF e do HIF-1 α , as cadelas foram separadas em grupos de acordo com as características clínico-patológicas.

Os resultados foram submetidos previamente à análise descritiva para determinação da normalidade e foram considerados com distribuição normal. Assim, as médias das análises referentes às quantificações séricas, protéicas e expressão gênica para os diferentes grupos foram comparados pelo teste t de student ou ANOVA seguido

do teste de Bonferroni. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (S.E.M.).

Para as técnicas de imuno-histoquímica e ELISA, a curva de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan Meier. Os pontos de corte para expressão e concentração sérica de cada proteína foram estabelecidos através da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Foram calculadas a sensibilidade e especificidade entre os valores obtidos e a ocorrência de óbito nas cadelas com neoplasia mamária. Os valores indicados por meio da curva ROC constituem o ponto de corte que podem promover um equilíbrio mais adequado de sensibilidade (verdadeiros positivos) e especificidade (falsos positivos) para o índice de expressão protéica como discriminador do risco de óbito nas cadelas com neoplasia mamária.

Para avaliar a influência simultânea dos fatores prognósticos sobre a mortalidade foi realizada a regressão logística multivariada. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism4 e Stats Direct.

Resultados

III. RESULTADOS

1. Análise da expressão protéica por imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica das proteínas VEGF e HIF-1 α foi realizada nos fragmentos tumorais de 30 cadelas com neoplasia mamária. Os resultados obtidos nas reações mostraram imunomarcação positiva para VEGF e para o HIF-1 α nas células tumorais, com marcação evidente no citoplasma, enquanto o estroma não apresentou imunorreatividade (Figuras 5 e 6).

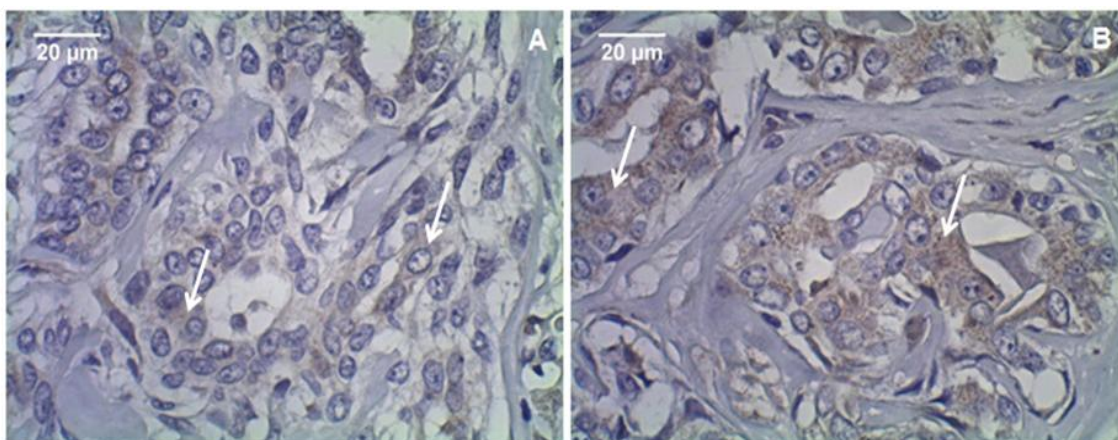


Figura 5. Fotomicrografia do procedimento imunohistoquímico demonstrando a marcação do anticorpo anti-VEGF em carcinoma mamário de cadela com diagnóstico histopatológico de carcinoma túbulo-papilar. **A.** Imuno-coloração de média intensidade. **B.** Imuno-coloração de alta intensidade. Kit STARR TREK, 400X.

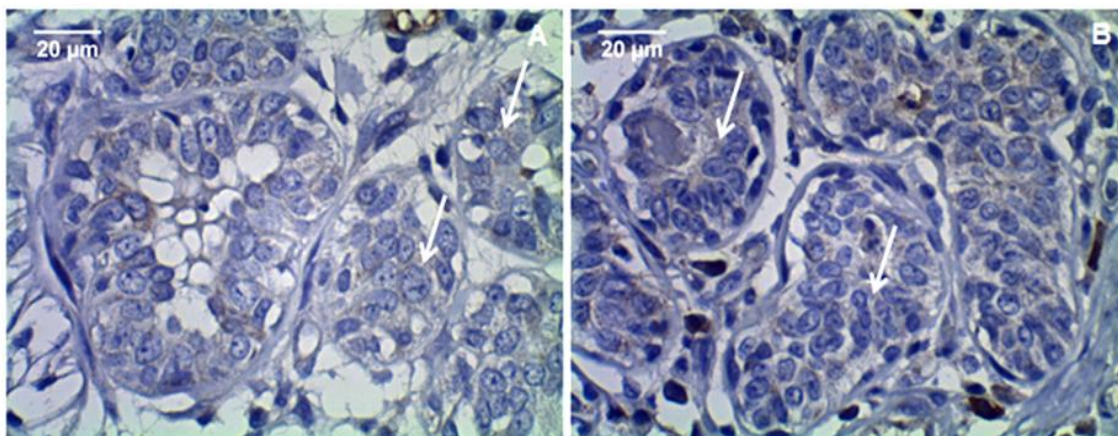


Figura 6. Fotomicrografia do procedimento imunohistoquímico demonstrando a marcação do anticorpo anti-HIF-1 α em carcinoma mamário de cadela com diagnóstico histopatológico de carcinoma túbulo-papilar. **A.** Imuno-coloração de baixa intensidade. **B.** Imuno-coloração de média intensidade. Kit STARR TREK, 400X.

A comparação entre as reações imuno-histoquímicas para as proteínas analisadas demonstrou aumento da intensidade da imunomarcação para a proteína VEGF (166.5 ± 4.593) quando comparada ao HIF-1 α (152.6 ± 4.628) ($p=0,03$) (Figura 7).

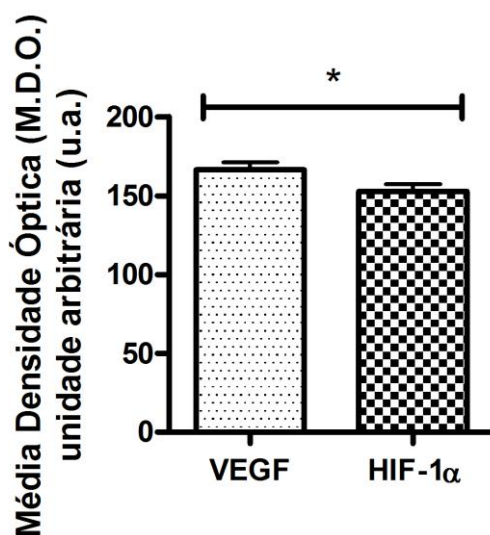


Figura 7. Média da expressão protéica do VEGF e do HIF-1 α nos fragmentos tumorais das cadelas do grupo de estudo ($p=0,03$).

* $p=$ valor significativo pelo teste t student's.

Os resultados da densitometria óptica foram comparados com as características clínico-patológicas das cadelas (tipo histológico, tamanho tumoral, localização tumoral, tempo de evolução, comprometimento dos linfonodos, estadiamento clínico, ulceração e vascularização) e com a evolução clínica (ocorrência de recidiva tumoral local, metástase e óbito). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão imuno-histoquímica do VEGF e do HIF-1 α em nenhuma das variáveis analisadas no grupo estudado ($p>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre as características clínico-patológicas e a média da densitometria óptica referente à expressão protéica do VEGF e de HIF-1 α nos grupos estabelecidos.

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	VEGF (u.a.)	HIF-1α (u.a.)
Tipo Histológico			
Maligno	24 (80%)	162,4 \pm 5,253	153,2 \pm 5,150
Benigno	6 (20%)	178,7 \pm 7,089	168,0 \pm 13,94
p		0,10	0,23
Tamanho tumoral			
T1	18 (60%)	174,6 \pm 4,613	164,2 \pm 6,205
T2	4 (13%)	155,7 \pm 19,10	149,9 \pm 14,99
T3	8 (27%)	153,7 \pm 8,998	141,1 \pm 8,355
p#		> 0,05	> 0,05
Linfonodos regionais			
N0	20 (67%)	169,2 \pm 6,362	161,6 \pm 6,936
N1/N2	10 (33%)	154,9 \pm 6,298	144,8 \pm 4,522
p		0,18	0,13
Localização Tumoral			
Múltiplos	15 (50%)	172,1 \pm 5,785	149,9 \pm 7,063
Únicos	15 (50%)	160,8 \pm 7,027	162,3 \pm 6,867
p		0,22	0,21
Tempo de evolução			
1 mês	7 (23%)	174,6 \pm 4,613	159,0 \pm 10,56
Até 6 meses	10 (33%)	155,7 \pm 19,10	149,5 \pm 6,273
Mais que 6 meses	13 (44%)	153,7 \pm 8,998	159,7 \pm 10,56
p#		0,09	> 0,05
Estadiamento clínico			
I	17 (57%)	177,9 \pm 5,049	166,9 \pm 7,245
II	3 (10%)	159,9 \pm 44,56	157,6 \pm 33,94
III	8 (27%)	156,1 \pm 8,381	143,1 \pm 9,120
IV	2 (6%)	152,2 \pm 8,290	144,1 \pm 5,529
p#		> 0,05	> 0,05
Ulceração			
Sim	4 (13%)	176,2 \pm 11,81	174,6 \pm 15,97
Não	26 (87%)	165,0 \pm 4,999	153,3 \pm 5,098
p		0,41	0,14
Vascularização			
Abundante	8 (27%)	151,8 \pm 7,567	146,4 \pm 10,47
Moderada	22 (73%)	171,8 \pm 5,264	159,7 \pm 5,573
p		0,06	0,24
Recidiva			
Sim	6 (20%)	153,5 \pm 7,640	136,9 \pm 5,444
Não	24 (80%)	171,3 \pm 4,884	161,0 \pm 5,688
p		0,12	0,06
Metástase			
Sim	6 (20%)	160,1 \pm 3,033	146,3 \pm 3,736
Não	24 (80%)	167,8 \pm 5,467	158,6 \pm 6,078
p		0,54	0,33
Censura			
Óbito	8 (27%)	161,5 \pm 4,999	155,2 \pm 80,161
Vivas	22 (73%)	168,3 \pm 6,009	156,5 \pm 6,206
p		0,51	0,91

* valor de p estatisticamente significante (teste *t* student's, $p < 0,05$).

diferente análise estatística (teste *Anova*)

2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

2.1. Concentração sérica do VEGF

A média das concentrações séricas de VEGF das cadelas com neoplasia mamária foi de 108 pg/mL e das cadelas controle de 42 pg/mL, com diferença estatisticamente significativa entre as dosagens dos dois grupos ($p=0,03$) (Tabela 5; Figura 8). No entanto, quando analisados os quatro períodos de coleta subseqüentes, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

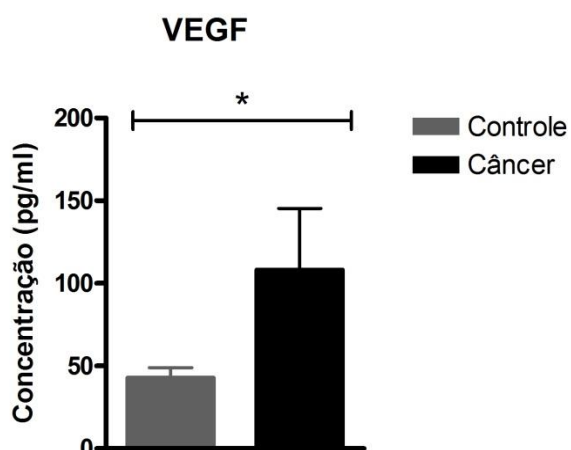


Figura 8. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle ($p=0,03$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

A análise univariada demonstrou aumento estatisticamente significativo das concentrações de VEGF em tumores com vascularização abundante ($p=0,02$) (Tabela 5; Figura 9), cadelas que apresentaram metástase ($p=0,003$) (Tabela 5; Figura 10) e óbito ($p=0,007$) (Tabela 5; Figura 11).

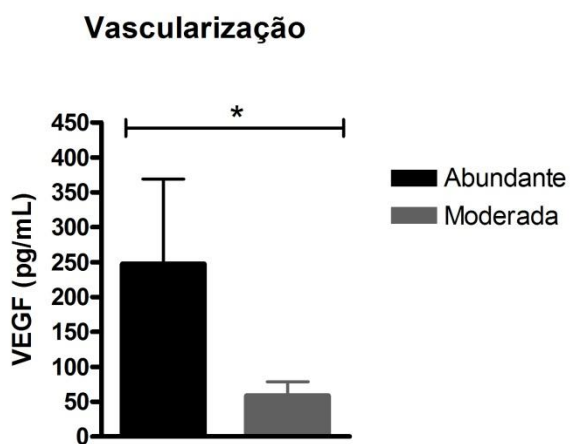


Figura 9. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em tumores com vascularização abundante e moderada ($p=0,02$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

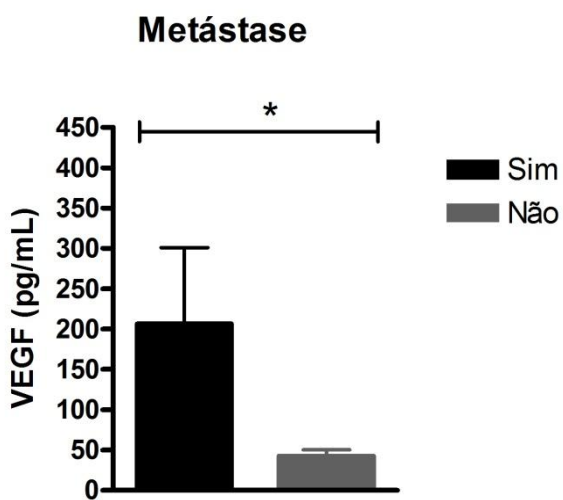


Figura 10. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em cadelas com neoplasia mamária com e sem metástase ($p=0,003$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

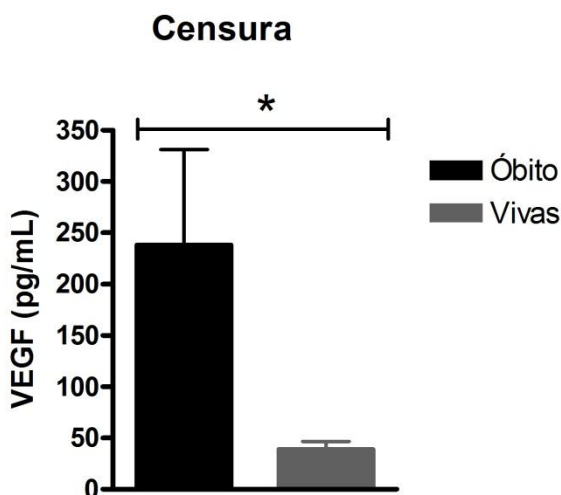


Figura 11. Representação da associação entre a concentração sérica de VEGF em cadelas com neoplasia mamária que continuaram vivas e que vieram à óbito ($p=0,007$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

Para análise da curva de sobrevida, o melhor ponto de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas cadelas do grupo teste foi de 75,483 pg/mL (Sensibilidade (95%IC) = 71% e Especificidade (95%IC) = 93%) (Figura 12).

Para avaliar a relação entre os níveis de VEGF no soro e a sobrevida das cadelas foi realizado o teste Kaplan Meier. Este procedimento demonstrou associação entre a alta concentração da proteína e a baixa taxa de sobrevida (O.R. 0,08117; IC 95%= 0,002003 a 0,09454; $p<0,0001$) (Figura 13).

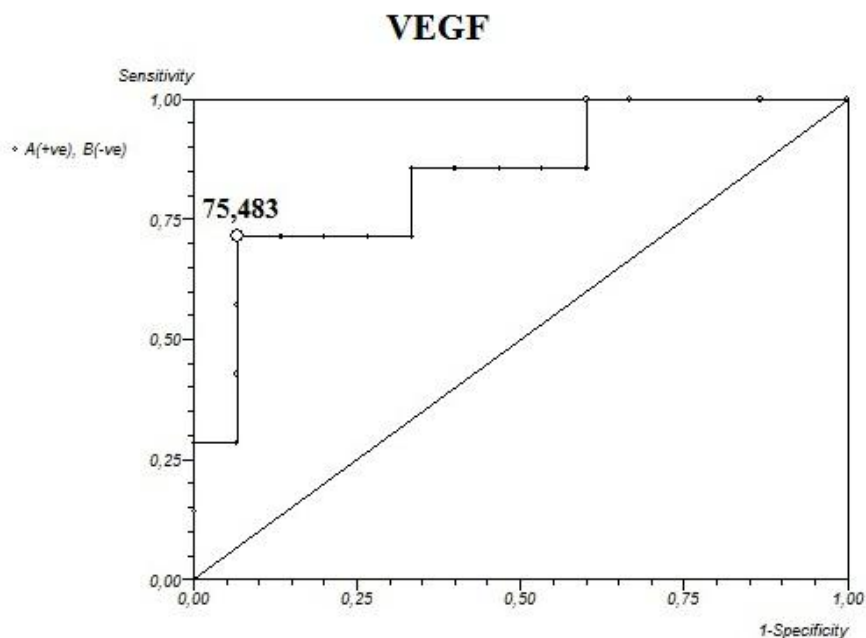


Figura 12. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste (n=30). Sensibilidade (95% IC) = 71%, Especificidade (95% IC) = 93%.

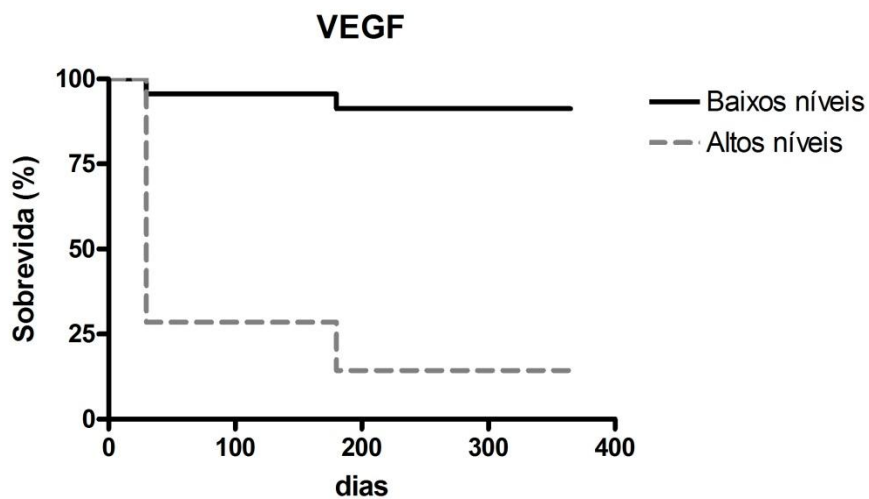


Figura 13. Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de VEGF (valor de corte: 75,483 pg/mL) (O.R. 0.08117; IC 95% = 0,002003 a 0,09454; $p < 0,0001$).

Tabela 5. Associação entre a concentração sérica de VEGF e os parâmetros clínico-patológicos das cadelas do grupo de estudo.

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	VEGF (pg/mL)
Característica Clínica		
Controle	50	42,60 ± 6,325
Amostras	30	108,2 ± 37,28
p		0,03*
Tipo Histológico		
Maligno	24 (80%)	125,4 ± 46,98
Benigno	6 (20%)	46,23 ± 13,11
p		0,39
Tamanho tumoral		
T1	18 (60%)	122,1 ± 58,12
T2	4 (13%)	132,8 ± 108,6
T3	8 (27%)	63,40 ± 6,664
p#		> 0,05
Linfonodos regionais		
N0	20 (67%)	106,9 ± 51,31
N1/N2	10 (33%)	111,0 ± 41,25
p		0,96
Localização Tumoral		
Múltiplos	15 (50%)	146,2 ± 71,87
Únicos	15 (50%)	78,88 ± 36,93
p		0,38
Tempo de evolução		
1 mês	7 (23%)	19,96 ± 7,074
Até 6 meses	10 (33%)	133,8 ± 58,29
Mais que 6 meses	13 (44%)	108,2 ± 37,28
p#		> 0,05
Estadiamento clínico		
I	17 (57%)	125,6 ± 62,65
II	3 (10%)	187,1 ± 162,9
III	8 (27%)	57,80 ± 7,944
IV	2 (6%)	37,85 ± 37,85
p#		> 0,05
Ulceração		
Sim	4 (13%)	225,6 ± 168,9
Não	26 (87%)	83,95 ± 30,99
p		0,16
Vascularização		
Abundante	8 (27%)	247,7 ± 121,4
Moderada	22 (73%)	58,93 ± 19,49
p		0,02*
Recidiva		
Sim	6 (20%)	43,37 ± 6,416
Não	24 (80%)	121,8 ± 44,67
p		0,43
Metástase		
Sim	6 (20%)	206,4 ± 94,40
Não	24 (80%)	42,64 ± 7,708
p		0,003*
Censura		
Óbito	8 (27%)	238,1 ± 92,95
Vivas	22 (73%)	38,84 ± 7,631
p		0,007*

* valor de p estatisticamente significativo (teste *t* student's, $p < 0,05$)

diferente análise estatística (teste *Anova*)

2.2. Concentração sérica do HIF-1 α

A concentração sérica de HIF-1 α das cadelas com neoplasia mamária foi 20% menor do que nas cadelas controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0006$) (Tabela 6; Figura 14).

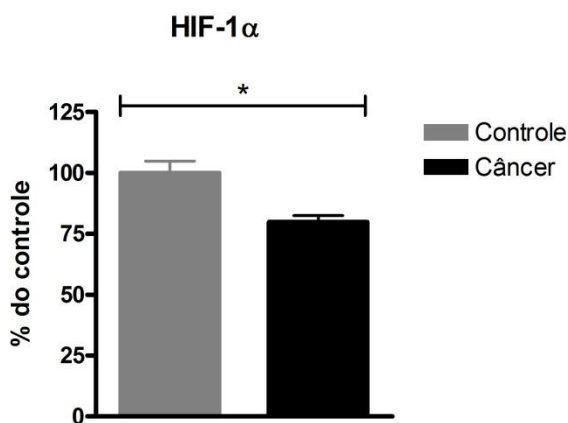


Figura 14. Representação da associação entre a concentração sérica de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle ($p=0,0006$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

Quando relacionados o percentual sérico de HIF-1 α com as características clínico-patológicas e evolução clínica, foi observado aumento estatisticamente significativo dos níveis de HIF-1 α em cadelas com histórico de recidiva tumoral ($p=0,03$) (Tabela 6; Figura 15).

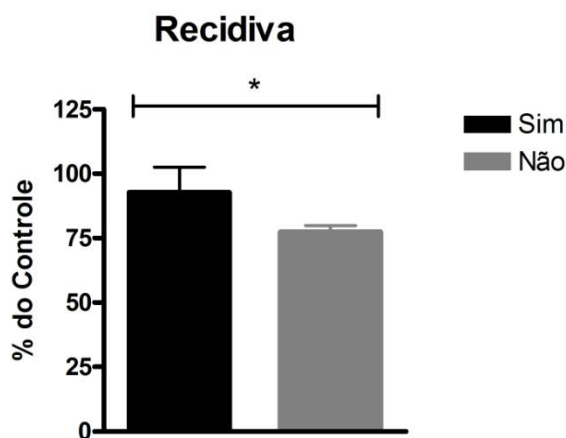


Figura 15. Representação da associação entre a concentração sérica de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária com e sem histórico de recidiva tumoral ($p=0,03$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

Para análise da curva de sobrevida, o melhor ponto de corte para discriminar o risco de óbito elevado nas cadelas do grupo teste foi de 71,825% de HIF-1 α no soro (sensibilidade de 63% e especificidade de 77%) (Figura 16). Não foi encontrada associação entre o percentual de HIF-1 α no soro e a sobrevida das cadelas através do teste de Kaplan Meier (O.R. 2,392; IC 95%= 0,4735 a 20,32; $p>0,05$) (Figura 17).

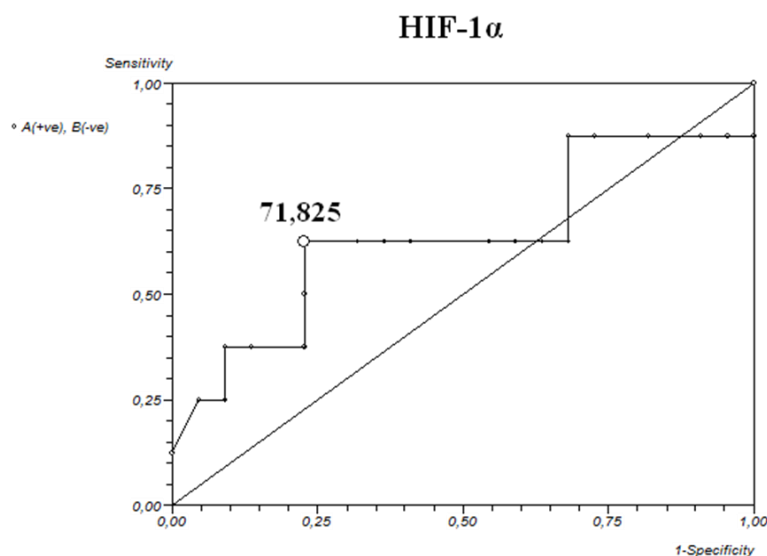


Figura 16. Valor de corte estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC no grupo teste ($n=30$). Sensibilidade (95%IC) = 63%, Especificidade (95%IC) = 77%.

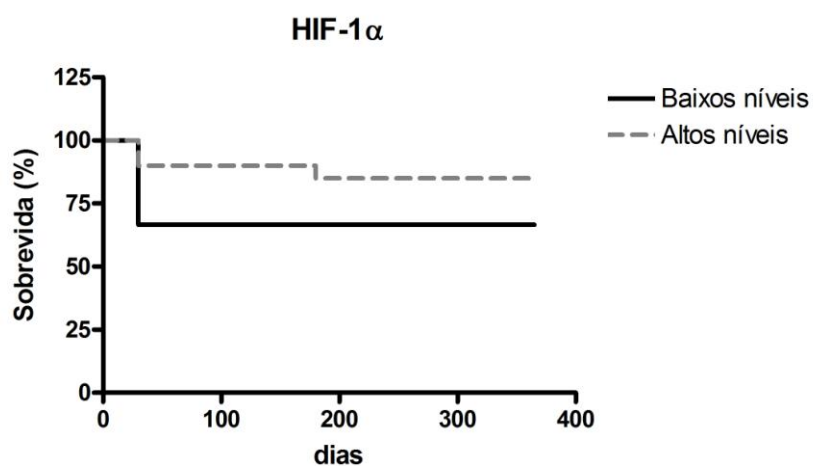


Figura 17. Sobrevida global das cadelas com alta e baixa concentração de HIF-1 α (valor de corte: 71,825% de HIF-1 α no soro) (O.R. 2,392; IC 95%= 0,4735 a 20,32; $p>0,05$).

Tabela 6. Associação entre o percentual sérico de HIF-1 α e os parâmetros clínico-patológicos das cadelas do grupo de estudo.

Parâmetros clínico-patológicos	Número de cadelas	HIF-1α (% em relação ao controle)
Característica Clínica		
Controle	50	100,0 \pm 4,864
Amostras	30	79,84 \pm 2,635
p		0,0006*
Tipo Histológico		
Maligno	24 (80%)	78,56 \pm 3,266
Benigno	6 (20%)	83,37 \pm 4,181
p		0,42
Tamanho tumoral		
T1	18 (60%)	81,41 \pm 2,714
T2	4 (13%)	89,14 \pm 14,12
T3	8 (27%)	71,66 \pm 2,903
p#		> 0.05
Linfonodos regionais		
N0	20 (67%)	78,76 \pm 2,323
N1/N2	10 (33%)	83,05 \pm 8,085
p		0,49
Localização Tumoral		
Múltiplos	15 (50%)	78,41 \pm 4,590
Únicos	15 (50%)	81,27 \pm 2,723
p		0,59
Tempo de evolução		
1 mês	7 (23%)	80,34 \pm 3,773
Até 6 meses	10 (33%)	77,98 \pm 3,379
Mais que 6 meses	13 (44%)	81,00 \pm 5,288
p#		> 0.05
Estadiamento clínico		
I	17 (57%)	82,00 \pm 3,155
II	3 (10%)	80,16 \pm 2,565
III	8 (27%)	78,42 \pm 8,886
IV	2 (6%)	75,99 \pm 3,872
p#		> 0.05
Ulceração		
Sim	4 (13%)	72,95 \pm 4,249
Não	26 (87%)	80,90 \pm 2,937
p		0,31
Vascularização		
Abundante	8 (27%)	76,95 \pm 7,928
Moderada	22 (73%)	80,89 \pm 2,294
p		0,51
Recidiva		
Sim	6 (20%)	92,73 \pm 9,778
Não	24 (80%)	77,60 \pm 2,357
p		0,03*
Metástase		
Sim	6 (20%)	77,72 \pm 4,241
Não	24 (80%)	80,26 \pm 3,070
p		0,72
Censura		
Óbito	8 (27%)	79,28 \pm 8,175
Vivas	22 (73%)	80,04 \pm 2,229
p		0,90

* valor de p estatisticamente significativa (teste *t* student's, $p < 0,05$).

diferente análise estatística (teste *Anova*)

Para análise multivariada, quando cada característica clínico-patológica foi associada ao maior risco de óbito, houve correlação estatisticamente significativa entre ambos metástase (O.R. 0,031831 a 0,795915; $p=0,03$) e alta concentração sérica de VEGF (O.R. 0,209823 a 0,893251; $p=0,003$) (Tabela 7).

Tabela 7. Regressão logística multivariada em cadelas com neoplasia mamária e a associação entre a influência das concentrações do VEGF e HIF-1 α e alguns parâmetros clínico-patológicos com aumento do risco de óbito.

Variáveis clínico-patológicas	E.S.	95% I.C.	<i>p</i>
Tempo de evolução	0,062822	-0,201779 a 0,327424	0,62
Tipo histológico	0,144504	-0,242743 a 0,360119	0,68
Metástase	0,183149	0,031831 a 0,795915	0,03*
Recidiva	0,149249	-0,200127 a 0,422529	0,46
Localização tumoral	0,017108	-0,210552 a 0,244769	0,87
Estadiamento clínico	0,128702	-0,126907 a 0,41003	0,28
Vascularização	0,145357	-0,096884 a 0,509534	0,17
Concentração sérica VEGF	0,163816	0,209823 a 0,893251	0,003*
Percentual sérico HIF-1 α	0,118175	-0,218706 a 0,274312	0,81

S.E. Erro padrão; I.C. Intervalo de confiança

* valor de p estatisticamente significativo

3. PCR em Tempo Real

3.1. Quantificação do RNA

A concentração dos RNAs foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific®) na absorvância de 260 nm e 280 nm.

Todas as quantificações estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Quantificação das amostras de RNA extraído pelo método do Trizol.

Amostra do tecido tumoral de cada cadela	Leitura (ng/ μ l)	260/280 nm
C1	2.104,8	1,94
C2	1.481,5	1,94
C3	2.620,4	2,00
C4	1.404,2	2,03
C5	1.149,6	1,90
C6	1.166,2	1,83
C7	1.173,8	1,86
C8	1.093,8	1,82
C9	973,3	1,85
C10	1.388,9	1,88
C11	1.563,0	1,89
C12	944,0	1,60
C13	396,5	1,70
C14	2.133,4	1,87
C15	1.810,8	1,76
C16	214,2	1,52
C17	2.716,9	1,89
C18	737,6	1,72
C19	1.534,9	1,56
C20	1.117,3	1,71
C21	836,7	1,44
C22	1.262,0	1,64
C23	1.100,6	1,51
C24	890,4	1,79
C25	428,2	1,67
C26	1.473,8	1,86
C27	1.576,8	1,89
C28	2.361,2	1,88
C29	975,9	1,65
C30	863,9	1,38

3.2. Integridade do RNA

A integridade do RNA foi constatada pela presença das subunidades ribossômicas 18S e 28S (Figura 18), sendo desprezadas as amostras que apresentaram o RNA degradado.

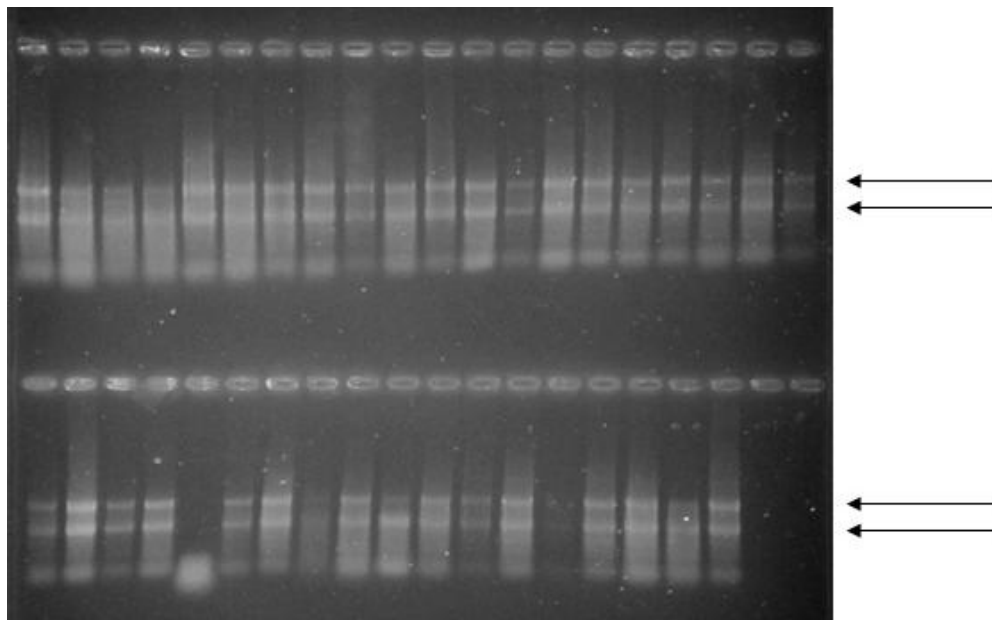


Figura 18. Padrão eletroforético das subunidades 18S e 28S do RNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Note que há separação das duas bandas do RNA ribossomal na maioria das amostras (seta).

3.3. Seleção dos genes endógenos

A seleção dos genes endógenos foi feita com auxílio do software DataAssist v3.0 (Applied Biosystems®), sendo utilizados como normalizadores da reação os genes que apresentaram maior estabilidade de amplificação (score menor que 1,5) entre as amostras do mesmo grupo de tecido mamário neoplásico e normal e entre todas as amostras analisadas. Os genes normalizadores *RPS19* (*Ribosomal Protein S19*) (score 0,9471) e *RPL8* (*Ribosomal Protein L8*) (score 1,05) foram selecionados como controles endógenos da reação, pois mostraram maior estabilidade de amplificação (score menor que 1,5) entre amostras de tecido mamário neoplásico e normal, nos quais foram testados também os genes *HPRT* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*) (score 1,2895) e *RPS5* (*Ribosomal Protein S5*) (score 1,6397) (Figura 19).

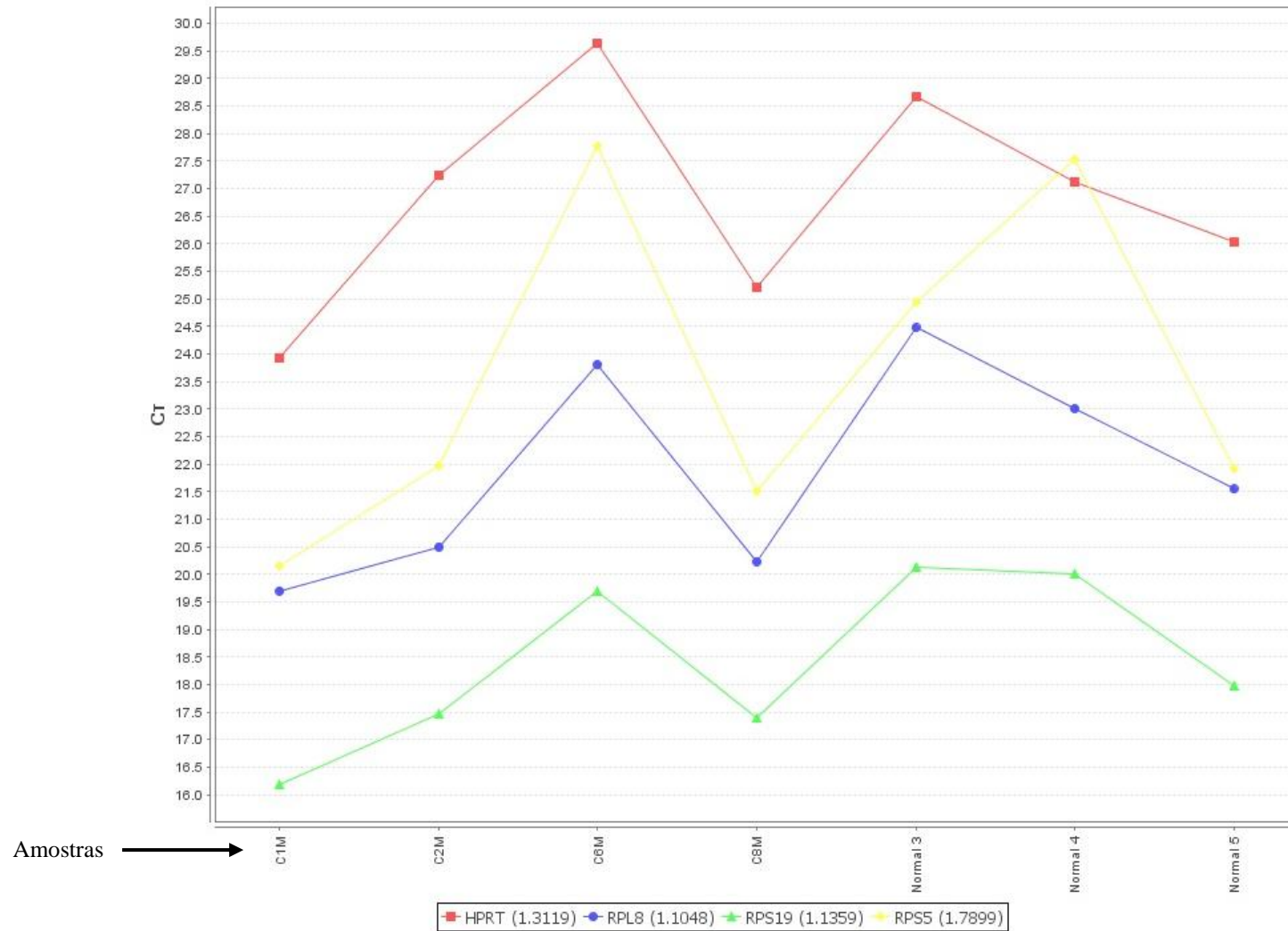


Figura 19. Análise realizada pelo Software DataAssist v3.0 mostrando a estabilidade dos genes candidatos à controles endógenos.

3.4. Análise da expressão gênica

3.4.1. Expressão gênica do *VEGFA*

No grupo de estudo (n=30 cadelas), 57% dos tumores com vascularização abundante apresentaram superexpressão do gene *VEGFA* (números 3, 4, 11 e 21) (Figura 20), representando aumento estatisticamente significativo ($p=0,02$; Figura 21) quando comparados aos 68% dos tumores com vascularização moderada que apresentaram subexpressão (números 2, 6, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 26 e 29) (Figura 20).

Das cadelas sem histórico de recidiva tumoral, 68% dos tumores apresentaram subexpressão do gene *VEGFA* (números 1, 6, 7, 9, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26 e 29) (Figura 20), estatisticamente significativo ($p=0,01$; Figura 22) quando comparados às cadelas com histórico de recidiva tumoral que apresentaram superexpressão (números 11, 14 e 21) (Figura 20).

Das cadelas que vieram a óbito após a retirada tumoral, 71% dos tumores apresentaram superexpressão do gene *VEGFA* (números 3, 4, 11, 13 e 14) (Figura 20). Das cadelas que continuaram vivas durante o período de acompanhamento, 73% dos tumores apresentaram subexpressão do gene *VEGFA* (números 1, 2, 6, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25 e 29) (Figura 20). Dessa forma, foi possível observar aumento estatisticamente significativo da expressão do gene *VEGFA* nos tumores das cadelas que vieram a óbito ($p=0,02$; Figura 23).

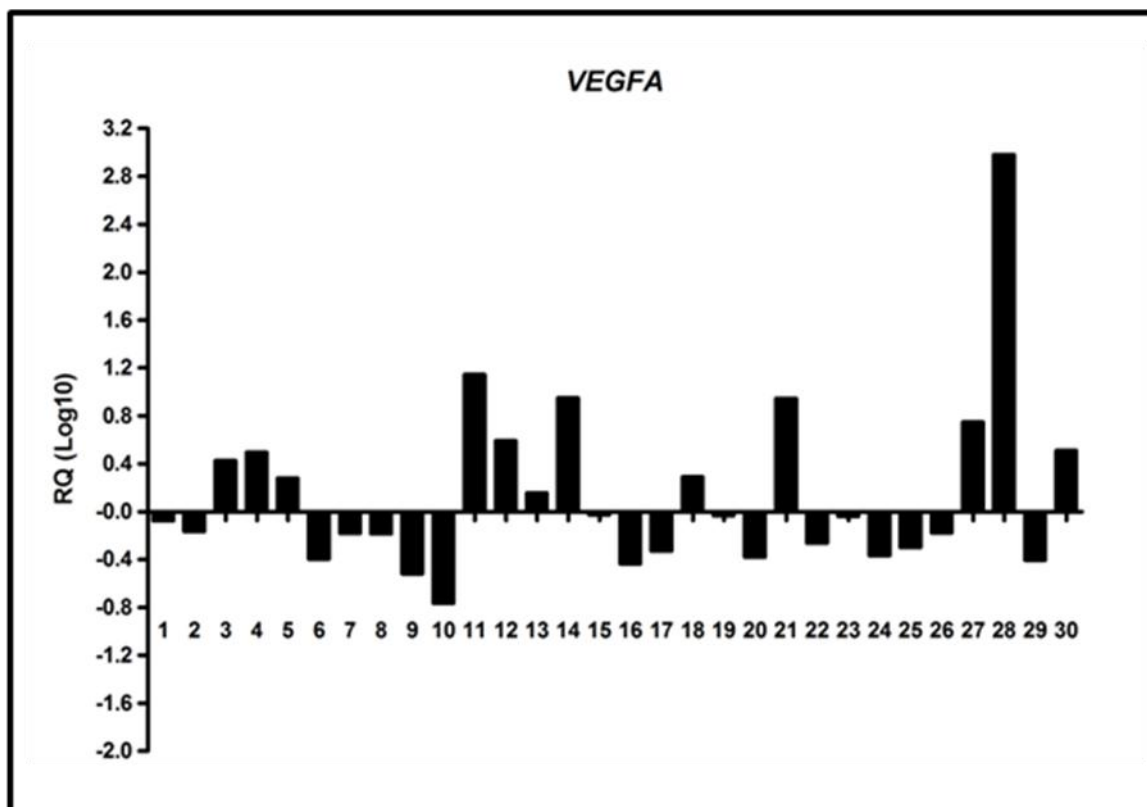


Figura 20. Expressão quantitativa do gene *VEGFA* em tumores mamários de cadelas. Valores da expressão gênica em Log_{10} .

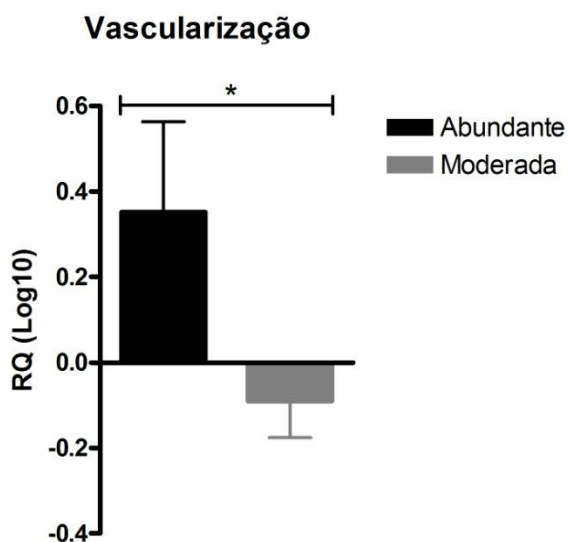


Figura 21. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene *VEGFA* em tumores mamários de cadelas com irrigação abundante e moderada ($p=0,02$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

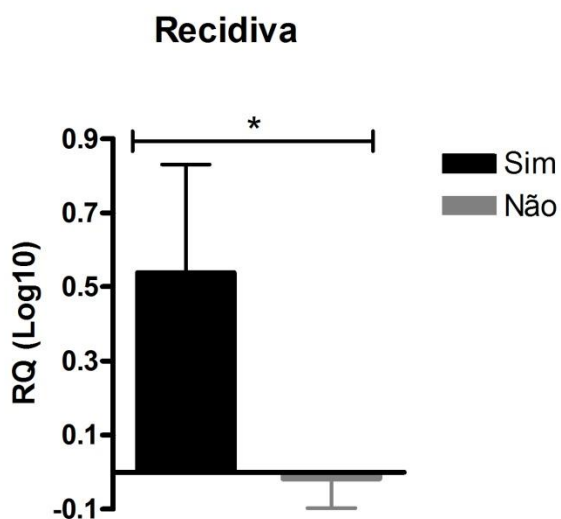


Figura 22. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene *VEGFA* em cadelas com neoplasia mamária com e sem histórico de recidiva tumoral ($p=0,01$).

* p = valor significativo pelo teste *t* student's.

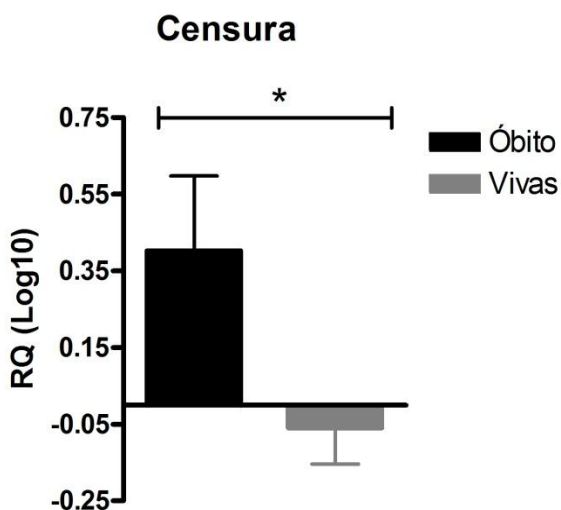


Figura 23. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene *VEGFA* em cadelas com neoplasia mamária que continuaram vivas e que vieram à óbito ($p=0,02$).

* p = valor significativo pelo teste *t* student's.

3.4.2. Expressão gênica do *HIF-1A*

Das 30 cadelas estudadas, 86% dos tumores com irrigação moderada apresentaram superexpressão do gene *HIF-1A* (números 2, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 26, 29 e 30) (Figura 24), representando aumento estatisticamente significativo ($p=0,01$; Figura 25) quando comparados aos tumores com irrigação abundante que apresentaram subexpressão (números 3, 4 e 11) (Figura 24).

Das cadelas que continuaram vivas durante o estudo, 91% dos tumores apresentaram superexpressão do gene *HIF-1A* (números 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29 e 30) (Figura 24) enquanto 50% dos tumores das cadelas que vieram à óbito apresentaram subexpressão do gene *HIF-1A* (números 3, 4, 11 e 14) (Figura 24), sendo possível observar diferença estatisticamente significativa quando comparados esses dois grupos ($p=0,003$; Figura 26).

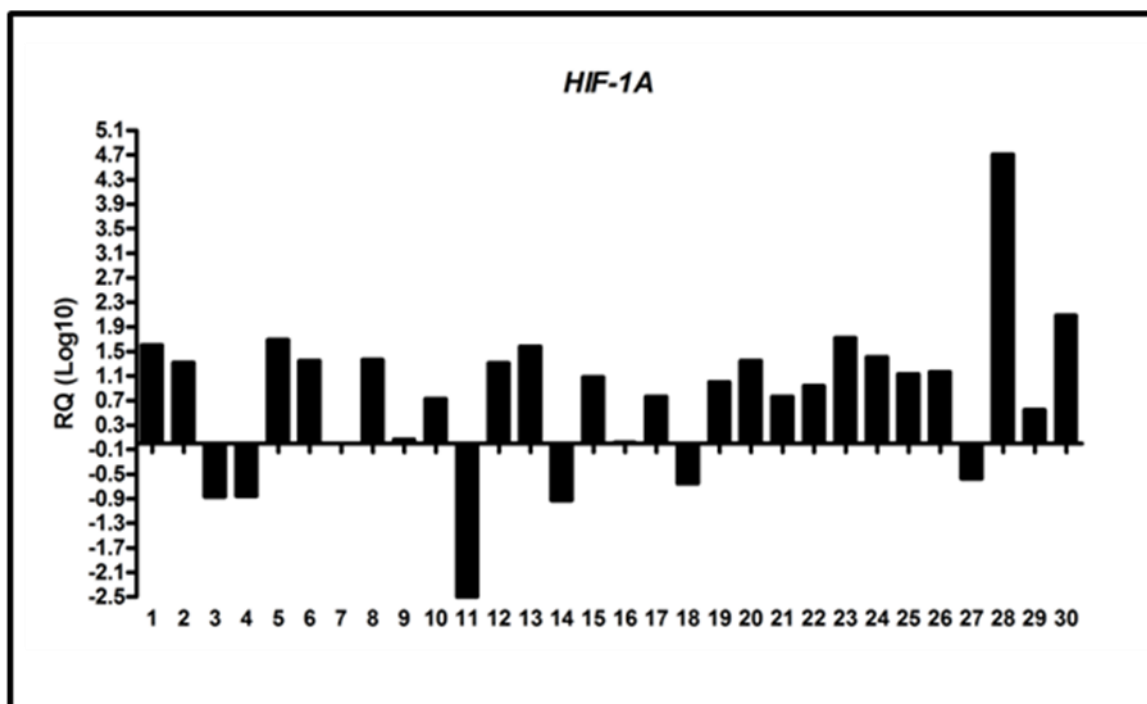


Figura 24. Expressão quantitativa do gene *HIF-1A* em tumores mamários de cadelas. Valores da expressão gênica em Log_{10} .

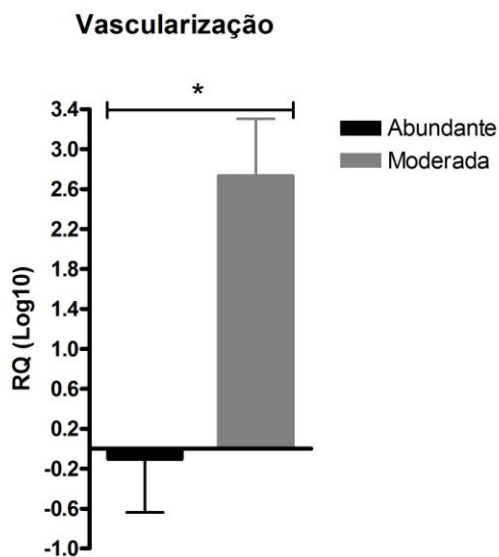


Figura 25. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene *HIF-1A* em tumores mamários de cadelas com irrigação abundante e moderada ($p=0,01$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

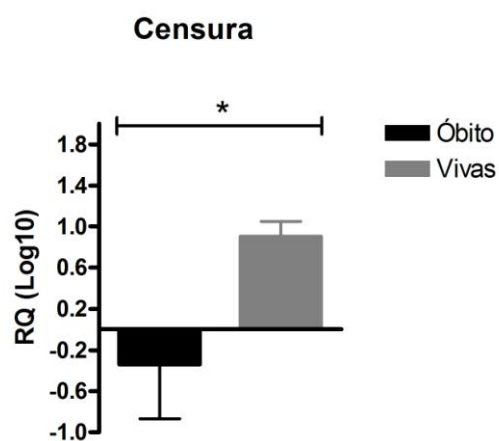


Figura 26. Representação da associação entre a expressão quantitativa do gene *HIF-1A* em cadelas com neoplasia mamária que continuaram vivas e que vieram à óbito ($p=0,003$).

* p = valor significativo pelo teste t student's.

Discussão

IV. DISCUSSÃO

Os fatores angiogênicos desempenham um papel importante no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases ⁽⁹³⁾, sendo a hipóxia uma condição essencial para o processo de angiogênese. ⁽⁸⁶⁾ Neste estudo foram avaliados os dois principais fatores desencadeadores do processo de angiogênese e sua relação com o prognóstico das cadelas com neoplasia mamária.

A técnica de imuno-histoquímica evidenciou a marcação citoplasmática do VEGF e do HIF-1 α em todos os fragmentos tumorais. Do mesmo modo, Qiu et al. ⁽⁷⁶⁾ analisou a expressão do VEGF em tumores malignos e benignos e em tecido normal de mama de cadelas, demonstrando marcação evidente nas células tumorais com aumento significativo da expressão dessa proteína no tecido neoplásico quando comparado ao normal, bem como nos tumores malignos quando comparados aos benignos sugerindo o envolvimento do VEGF na progressão tumoral. A imunohistoquímica tem sido utilizada para verificar a expressão do HIF-1 α em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. ⁽⁸⁶⁾ Schindl et al. ⁽⁹³⁾ encontraram marcação citoplasmática forte do HIF-1 α em 23% dos tecidos de pacientes com neoplasia mamária.

Nossos resultados não demonstraram correlação entre a expressão imuno-histoquímica do VEGF e do HIF-1 α com nenhuma das variáveis analisadas no grupo estudado. Ao contrário, Al-Dissi et al. ⁽⁴⁵⁾ demonstraram associação entre o aumento da expressão do VEGF e o aumento do marcador de proliferação celular Ki-67 em adenocarcinoma mamário de cães. Assim como o estudo de Millanta et al. ⁽⁹⁴⁾ que relacionou o aumento da expressão do VEGF com comportamento tumoral mais agressivo. Estudo de Zhong et al. ⁽⁹⁵⁾ encontrou aumento da expressão do HIF-1 α em 29% dos tumores primários de mulheres e em 69% dos tumores com metástase,

demonstrando a participação desse fator na progressão tumoral. Ainda, de acordo com Generali et al. ⁽⁹⁶⁾, o aumento da expressão do HIF-1 α pode caracterizar baixa resposta à terapia adjuvante com tamoxifeno desfavorecendo o prognóstico de pacientes com câncer de mama.

Nesse estudo, a expressão imuno-histoquímica do VEGF foi significativamente maior do que a do HIF-1 α . A expressão do VEGF nas células tumorais está sob o controle do HIF-1. ^(40, 61), entretanto, a ativação de oncogenes e a perda da função de genes supressores tumorais, como o PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10*), pVHL e p53 têm sido demonstrada como capaz de modular a expressão do HIF-1 em alguns tipos tumorais. ⁽⁹⁷⁾

Na oncologia veterinária, a expressão do VEGF e a sua relação com o comportamento biológico dos tumores é ainda pouco estudada, no entanto, a expressão do VEGF tem sido correlacionada com pior prognóstico ⁽²⁾, assim como a expressão do HIF-1 α . ⁽⁹⁵⁾

Como verificado pela técnica de ELISA, os níveis séricos de VEGF foram significativamente maiores nas cadelas com neoplasia mamária, quando comparados aos controles. Da mesma forma, alguns estudos têm relacionado fatores angiogênicos e inflamatórios à malignidade tumoral e indicam que esses marcadores podem ser usados para prever o prognóstico. ⁽⁹⁸⁻⁹⁹⁾ Estudo de Kato et al. ⁽¹⁰⁰⁾ demonstrou aumento dos níveis séricos de VEGF em cadelas com neoplasia mamária maligna quanto comparados às cadelas com neoplasia mamária benigna, assim como nas cadelas que apresentaram metástase pulmonar após a retirada do tumor. De acordo com Thielemann et al. ⁽¹⁰¹⁾ altos níveis de VEGF foram verificados em pacientes com câncer de mama de pior estadiamento clínico e com metástase para linfonodos axilares, indicando o importante

papel do VEGF na neovascularização dos tumores. Assim como nos estudos de Jia et al.⁽¹⁰²⁾ e Kapahi et al.⁽¹⁰³⁾ que encontraram elevadas concentrações de VEGF em pacientes com câncer de mama bem como sua relação com a baixa taxa de sobrevida. No entanto, Duranyildiz et al.⁽¹⁰⁴⁾ e El Tarhouny et al.⁽¹⁰⁵⁾ não encontraram diferença significativa nos níveis séricos de VEGF entre os grupos com câncer de mama e controle.

As correlações entre o aumento nos níveis de VEGF e os fatores de malignidade tumoral, envolvendo os parâmetros clínico-patológicos indicadores de pior evolução clínica, podem caracterizar esse fator de crescimento como marcador de prognóstico ruim. Trabalhos relacionando o VEGF com esses parâmetros apresentam resultados controversos na literatura. Estudos de Coskun et al.⁽¹⁰⁶⁾ e Perez-Rivas et al.⁽¹⁰⁷⁾ verificaram altos níveis de VEGF em pacientes com tumores de mama altamente invasivos e metastáticos. Da mesma forma, Berezov et al.⁽¹⁰⁸⁾ encontraram relação significativa entre o aumento dos níveis de VEGF e tumores infiltrativos considerando-o como um fator prognóstico de avaliação conjunto aos sinais clínicos e morfológicos do câncer de mama. Ao contrário, Hodorowicz-Zaniewska et al.⁽¹⁰⁹⁾ não encontraram associação entre os níveis de VEGF e os parâmetros clínico-patológicos estudados, e portanto não consideram o VEGF um potencial marcador prognóstico no câncer de mama. Nesse sentido, o VEGF tem sido considerado um importante indicador do desenvolvimento do câncer, sendo seus níveis séricos muitas vezes utilizados para estimar o grau de progressão do tumor.⁽¹¹⁰⁾

Pela curva de Kaplan-Meier foi observado que 75% das cadelas que vieram a óbito apresentaram níveis elevados de VEGF. Esses resultados sugerem que o aumento nos níveis desse fator de crescimento pode ser considerado uma marcação prognóstica independente para a sobrevida e na identificação de pacientes com pior prognóstico. A

angiogênese tem seu papel no desenvolvimento do tumor e na formação de metástases, sendo um importante fator preditor do tempo livre da doença e da taxa de sobrevida global de pacientes com câncer. ⁽²⁰⁾ Ao contrário, Bachelot et al. ⁽¹¹¹⁾ não encontraram relação entre a taxa de sobrevida de pacientes com câncer de mama e os níveis séricos de VEGF.

Através da análise multivariada com relação ao óbito, foi encontrada associação entre o desenvolvimento de metástase e o aumento nas concentrações de VEGF. Tem-se bem estabelecido na literatura que o risco de recidiva e óbito em pacientes com câncer de mama é relativamente proporcional ao tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos e presença de metástases. ⁽²⁰⁾ Além disso, de acordo com Kato et al. ⁽¹⁰⁰⁾ o aumento na concentração sérica de VEGF pode ser utilizado como marcador para progressão tumoral, recidiva, bem como para a sobrevida dos pacientes com câncer de mama, além de estar relacionado com a baixa resposta à terapias.

Ao contrário dos achados para VEGF, os níveis séricos de HIF-1 α foram menores nas cadelas com neoplasia mamária quando comparadas às controles. A quantificação do HIF-1 α no soro de cadelas com neoplasia mamária é escassa na literatura. Ece et al. ⁽¹¹²⁾ analisaram os níveis séricos de HIF-1 α em pacientes diabéticos com câncer de mama e em pacientes saudáveis, demonstrando aumento significativo desse fator no soro dos pacientes com câncer de mama. Estudo de Liang et al. ⁽¹¹³⁾ encontraram aumento dos níveis séricos de HIF-1 α em pacientes com câncer de pulmão, assim como Jia et al. ⁽¹¹⁴⁾ que encontraram aumento dos níveis séricos de HIF-1 α em pacientes com câncer de fígado.

Por outro lado, os níveis séricos de HIF-1 α foram significativamente maiores em cadelas que apresentaram recidiva tumoral. No câncer de mama, o HIF-1 α , um

importante fator que age como regulador central em situações de hipóxia e tem demonstrado associação com a morbidade e mortalidade. ⁽¹¹²⁾

Nesse estudo, a técnica de qPCR foi realizada a fim de verificar a influência da expressão gênica do *VEGFA* e do *HIF-1A* no prognóstico das cadelas com neoplasia mamária. Como esperado, o *VEGFA* demonstrou-se superexpresso em tumores com características de pior prognóstico, ao contrário da expressão gênica do *HIF-1A*.

Diversos autores têm demonstrado que em condições de hipóxia, os HIFs podem induzir a expressão de inúmeros genes, em especial do *VEGF*. ^(61, 42, 70, 115) No entanto, neste estudo, a expressão gênica do *HIF-1A* não seguiu o mesmo padrão que a expressão gênica do *VEGFA*, e isto pode se justificar pelo fato do *HIF-1A* agir sinergicamente com outros fatores que regulam a produção do *VEGFA*, em resposta a hipóxia. ⁽¹¹⁶⁾

Estudos de Mohammed et al. ⁽¹¹⁷⁾, Santos et al. ⁽²⁾ Zhang et al. ⁽⁴⁷⁾ e Koukourakis et al. ⁽⁷⁵⁾ associaram o aumento da expressão gênica de *VEGF* com maior agressividade das células tumorais, ocorrência de metástase e pior sobrevida de pacientes com neoplasia mamária. Em cães, a expressão gênica do *VEGF* foi previamente estudada por qPCR e o aumento da sua expressão foi relacionado à maior agressividade tumoral. ⁽⁹⁴⁾ Em concordância com os nossos resultados, Kallergi et al. ⁽⁴⁰⁾ analisaram a expressão gênica de *VEGF* em linhagens de células de câncer de mama metastática (MDA-MB-231) e não metastática (MCF-7), encontrando aumento da expressão do *VEGF* nas células mais agressivas, especialmente as metastáticas.

No presente estudo, o gene *HIF-1 α* apresentou-se superexpresso em tumores com características de melhor prognóstico. A hipóxia desempenha um papel crítico na formação de metástase em tumores de mama. Está bem estabelecido que o *HIF-1 α* é um

regulador da homeostase do oxigênio nos tecidos funcionando como modulador da sobrevivência das células. Nesse contexto, o aumento da expressão do HIF-1 α em vários tipos de câncer tem sido associado com comportamento agressivo, desenvolvimento de metástases à distância, bem como resistência a tratamentos em pacientes com câncer de mama.⁽⁸³⁾ Assim, ao contrário dos nossos resultados, Schito et al.⁽¹¹⁸⁾ relacionou o aumento da expressão dos HIFs com a invasão tecidual e consequente progressão do câncer.

Resultados que relacionam o papel HIF-1 α com a progressão do câncer na literatura são controversos, uma vez que, em condições de hipóxia grave, este fator se comporta como um gene capaz de promover a apoptose e morte celular^(60, 119), entretanto, a maioria dos autores sugerem que o HIF-1 α pode ser adicionado à lista de novos e promissores fatores prognósticos fornecendo informações importantes no manejo clínico de pacientes com câncer de mama.⁽⁹⁷⁾

Nesse contexto, diversas pesquisas dedicam-se a desenvolver estratégias de tratamento que possam inibir a progressão tumoral, sendo a via mediada pelo VEGF e/ou HIF-1 α , o principal alvo de novos agentes terapêuticos.^(58, 120-121)

Conclusões

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que:

1. A relação entre a alta expressão imuno-histoquímica do VEGF e a baixa expressão do HIF-1 α nos tecidos tumorais sugere que outros mecanismos podem ativar a transcrição do VEGF na angiogênese dos tumores mamários.
2. Altos níveis séricos de VEGF, bem como o aumento da expressão gênica no tecido de cadelas com neoplasia mamária tiveram relação com parâmetros clínico-patológicos de prognóstico reservado e pior evolução clínica sugerindo o importante papel desse fator na progressão da doença, destacando-o como potencial marcador prognóstico para cadelas com neoplasia mamária.
3. O aumento do percentual sérico do HIF-1 α nas cadelas do grupo controle, nas cadelas com neoplasia mamária e histórico de recidiva tumoral, bem como o aumento da expressão gênica do *HIF-1A* no tecido de cadelas com melhor prognóstico reforça o papel controverso do HIF-1 α na progressão tumoral, não confirmando esse fator como marcador prognóstico em neoplasias mamárias.

Referências

VI. REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas 2011: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2011; <http://www.inca.gov.br/estimativa/2011/>.
2. Santos A, Lopes C, Marques RM, Amorim I, Ribeiro J, Frias C, et al. Immunohistochemical analysis of urokinase plasminogen activator and its prognostic value in canine mammary tumours. *Vet J* 2010;143:268-275.
3. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas sobre a Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil – 2002. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2003; <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/>.
4. Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Fekih M, Khairi H, Helal AN, et al. Combined effects of IL-8 and CXCR2 gene polymorphisms on breast cancer susceptibility and Aggressiveness. *BMC Cancer* 2010;10:283.
5. Gelaleti, GB, Jardim, BV, Leonel, C, Moschetta, MG, Zuccari, DAPC. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunology Immunopathology* 2012;146:106-12.
6. Michel E, Feldmann SF, Kowalewski MP, Bley CR, Boos A, Guscetti F. Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. *BMC Veterinary Research* 2012;8:72.
7. Pawtowski KM, Mucha J, Majchrzak K, Motyl T, Król M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet Res* 2013;9:119.
8. Sorenmo K. An Update On Canine Mammary Gland Tumors. *Proceedings of the 16th Acvim Forum* 1998;387-8.
9. Queiroga F, Lopes C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores de prognóstico. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2002;543:119-127.
10. Zuccari DAPC, Pavam MV, Terzian CB, Pereira RS, Ruiz CM, Andrade JC. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. *Pesq. Vet. Bras* 2008;28:207-215.
11. Andrade FH, Figueiroa FC, Bersano PR, Bissacot DZ, Rocha NS. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagn Pathol* 2010;5:45.
12. Chu Pei-Yi, Hsu NC, Liao AT, ShihNeng-Yao, HouMing-Feng, LiuChen-Hsuan. Overexpression of a-enolase correlates with poor survival in canine mammary carcinoma. *BMC Veterinary Research* 2011;7:62.
13. Azuma K, Osaki T, Tsuka T, Imagawa T, Minami S, Okamoto Y. Plasma free amino acid profiles of canine mammary gland tumors. *J Vet Sci* 2012;13:433-6.
14. Schneider, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 1970;26:419-426.
15. Mottollese M, Morelli L, Agrimi U, Benevolo M, Sciarretta F, Antonucci G, et al. Spontaneous Canine Mammary Tumors – A Model for Monoclonal Antibody Diagnosis and Treatment of Human Breast Cancer. *Laboratory Investigation* 1994;71:182.

16. Phillips JC, Lembcke L, Chamberlin T. A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. *Genomics* 2010;96:220.
17. MacEwen EG. Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastases Review* 1990;9:125-136.
18. Peleteiro MC. Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 1994;89:10-29.
19. Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine Mammary Gland Neoplasms. *Journal of the American Veterinary Association* 1993;19:61-89.
20. Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2002;48:113-31.
21. Bodey B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther.* 2002;2:371-93.
22. Huang JX, Li FY, Xiao W, Song ZX, Qian RY, Chen P, et al. Expression of thymidylate synthase and glutathione-S-transferase pi in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2009;15:4316-21.
23. Gralow J, Ozols RF, Bajorin DF, Cheson BD, Sandler HM, Winer EP, et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. A report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2008;26:313-25.
24. Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S. Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res.* 2007;298:469-77.
25. Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AAA. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Rev Bras Cancerologia.* 2007;53:305-316.
26. Yang Y, Pospisil P, Iyer LK, Adelstein SJ, Kassis AI. Integrative genomic data mining for discovery of potential blood-borne biomarkers for early diagnosis of cancer. *PLoS One.* 2008;3:e3661.
27. Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res.* 2007;27:1247-55.
28. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 1;14:6735-41.
29. Barginear MF, Bradley T, Shapira I, Budman DR. Implications of applied research for prognosis and therapy of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;65:223-34.
30. Derin D, Soydinc HO, Guney N, Tas F, Camlica H, Duranyildiz D, et al. Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. *Med Oncol.* 2007;24:163-8.
31. Zuccari DA, Castro R, Gelaleti GB, Mancini UM. Interleukin-8 Expression Associated with Canine Mammary Tumors. *Genet Mol Res.* 2011;10:1522-32.
32. Thomas E, Berner G. Prognostic and Predictive Implications of HER2 Status for Breast Cancer Patients. *European Journal of Oncology Nursing* 2000;4:10-17.
33. Harris AL. Hypoxia — a key regulatory factor in tumour growth. *Nature* 2002;2:38-47.
34. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1702-13.

35. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer*. 2010 13;9:191.
36. Carmeliet, P, Jain, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
37. Vordermark D. Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. *BMC Med* 2010;8:45.
38. Milani M, Harris AL. Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:2766-73.
39. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med*. 2007;4:e186.
40. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009;11:84.
41. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of Hypoxia in the Hallmarks of Human Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009;107:1053–1062.
42. Higashimura Y, Nakajima Y, Yamaji R, Harada N, Shibasaki F, Nakano Y, et al. Up-regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression by HIF-1 activity depending on Sp1 in hypoxic breast cancer cells. *Arch BiochemBiophys*, 2011;509:1-8.
43. Dachs GU, Kano M, Volkova E, Morrin HR, Davey VCL, Harris GC, et al. A profile of prognostic and molecular factors in European and Māori breast cancer patients. *BMC Cancer* 2010;10:543
44. Cao Y, Li CY, Moeller BJ, Yu D, Zhao Y, Dreher MR, et al. Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. *Cancer Res*. 2005;65:5498-505.
45. Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Can Vet J* 2010;51:1109–1114.
46. Finley SD, Dhar M, Popel AS. Compartment model predicts VEGF secretion and investigates the effects of VEGF trap in tumor-bearing mice. *Front Oncol*. 2013;3:196.
47. Zhang J, Lu A, Li L, Yue J, Lu Y. p16 Modulates VEGF expression via its interaction with HIF-1alpha in breast cancer cells. *Cancer Invest*. 2010;28:588-97.
48. Liu AY, Ouyang G. Tumor Angiogenesis: A New Source of Pericytes. *Current Biology* 2013;23:565-568.
49. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314:15-23.
50. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F, et al. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J*. 2001;15:1239-41.
51. Cappellari O, Cossu G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. *Circulation Research* 2013;113:341-348.

52. Hilmi C, Guyot M, Pagès G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids*. 2012;2012:162692.
53. Milkiewicz M, Hudlicka O, Shiner R, Egginton S, Brown MD. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat. *J Physiol*. 2006;577:671-8.
54. Bergers G, Benjamin LB. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews – Cancer*. 2003;3:401-410.
55. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther*. 2005;4:315-21.
56. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011;17:1359-70.
57. Tang L, Ma X, Tian Q, Cheng Y, Yao H, Liu Z, et al. Inhibition of angiogenesis and invasion by DMBT is mediated by downregulation of VEGF and MMP-9 through Akt pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 2013;56:204–213
58. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW, et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *J Pineal Res*. 2010;48:178-84.
59. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* 2002; 8.
60. Kim J-Y, Ahn H-J, Ryu J-H, Suk K, Park J-H. BH3-only Protein Noxa Is a Mediator of Hypoxic Cell Death Induced by Hypoxia-inducible Factor 1. *J. Exp. Med*. 2004;199:113–123.
61. Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna R, Khanna HD. Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Relation to Oxidative Damage and Antioxidant Status in Patients with Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2011;14:181-184.
62. Brito LGO, Schiavon VF, de Andrade JM, Tiezzi DG, Peria FM, Marana HRC. Expression of Hypoxia-inducible factor 1- α and Vascular endothelial growth factor-C in locally advanced breast cancer patients. *Clinics* 2011;66:1313-1319.
63. Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst Biol*. 2008;2:77.
64. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, Inoue K. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2010;4:15–34.
65. Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:538-48.
66. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D, Poli A. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science* 2006;81:350–357.
67. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:519-30.
68. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:21-6.

69. Clinkard D, Amoodi H, Kandasamy T, Grewal AS, Chen S, Qian W, et al. Changes in the cochlear vasculature and vascular endothelial growth factor and its receptors in the aging c57 mouse cochlea. *Otolaryngol.* 2013 [Epub ahead of print]
70. Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Le Bourhis X. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer.* 2010;9:157.
71. Greenberg S, Rugo HS. Triple-negative breast cancer: role of antiangiogenic agents. *Cancer J.* 2010;16:33-8.
72. Delli Carpini J, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis.* 2010;13:43-58.
73. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling* 2007;19:2003–2012.
74. Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70:281-9.
75. Koukourakis MI, Limberis V, Tentis I, Kontomanolis E, Kortsaris A, Sivridis E, et al. Serum VEGF levels and tissue activation of VEGFR2/KDR receptors in patients with breast and gynecologic cancer. *Cytokine* 2011;53:370–375.
76. Qui CY, Lin DG, Wang JQ, Li CY, Deng GZ. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. *Veterinary Research Communications* 2008;32:463- 472.
77. Xiong J, Yang Q, Li J, Zhou S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis.* 2013[Epub ahead of print]
78. Shin JM, Jeong YJ, Cho HJ, Park KK, Chung IK, Lee IK, et al. Melittin Suppresses HIF-1 α /VEGF Expression through Inhibition of ERK and mTOR/p70S6K Pathway in Human Cervical Carcinoma Cells. *PLoS One.* 2013 Jul 23;8(7):e69380.
79. Lu J, Zhang K, Chen S, Wen W. Grape seed extract inhibits VEGF expression via reducing HIF-1 α protein expression. *Carcinogenesis.* 2009;30:636-44.
80. Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, Sisci D, Panno ML, Andò S, et al. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2011;286:10773-82.
81. Yang L, Zhao W, Zuo WS, Wei L, Song XR, Wang XW, et al. Silencing of osteopontin promotes the radiosensitivity of breast cancer cells by reducing the expression of hypoxia inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor. *Chin Med J (Engl)* 2012;125:293-9.
82. Druyan S, Cahaner A, Ashwell CM. The Expression Patterns of Hypoxia-Inducing Factor Subunit α -1, Heme Oxygenase, Hypoxia Upregulated Protein 1, and Cardiac Troponin T During Development of the Chicken Heart. *Poultry Science* 2007;86:2384–2389.
83. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer and metastasis initiating cells *J Cell Mol Med.* 2013;17:30-54.

84. Li Z, Wang D, Na X, Schoen SR, Messing EM, Wu G. The VHL protein recruits a novel KRAB-A domain protein to repress HIF-1 α transcriptional activity. *The EMBO Journal* 2003;22:1857-1867.
85. Tung KH, Lin CW, Kuo CC, Li LT, Kuo YH, Lin CW, et al. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 α and VEGF signaling. *Cancer Lett.* 2013;331:58-67.
86. Dales JP, Beaufils N, Silvy M, Picard C, Pauly V, Pradel V, et al. Hypoxia inducible factor 1 α gene (HIF-1 α) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Med.* 2010;8:44.
87. Matsuo Y, Ding Q, Desaki R, Maemura K, Mataka Y, Shinci H, et al. Hypoxia inducible factor-1 α plays a pivotal role in hepatic metastasis of pancreatic cancer: an immunohistochemical study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013 [Epub ahead of print]
88. Maschio LB, Madalozzo BB, Capellasso BA, Jardim BV, Moschetta MG, Jampietro J, et al. Immunohistochemical investigation of the angiogenic proteins VEGF, HIF-1 α and CD34 in invasive ductal carcinoma of the breast. *Acta Histochem.* 2013 [Epub ahead of print]
89. Misdorp, W., Else, R.W., Hellmén, E., Lipscomb, E. Definitions and explanatory notes. *Who histological classification of mammary tumors of the dog and cat.* Armed Forces Institute of Pathology 1999:18-27
90. Owen, L. N. *TNM Classification of tumors of domestic animals*, 1st ed. WHO, Geneva, 1980.
91. Cassali GD, Bertagnolli AC, Lavallo GE, Tavares WLF, Ferreira E, Silva AE, et al. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasms in dogs. 2010. 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009, São Paulo. Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009.
92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008;3:1101-1108.
93. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1831-7.
94. Millanta F, Caneschi V, Ressel L, Citi S, Poli A. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. *J Comp Pathol.* 2010;142:36-42.
95. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999;59:5830-5.
96. Generali D, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Wigfield S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α expression predicts a poor response to primary chemoendocrine therapy and disease-free survival in primary human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4562-8.
97. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, et al. Levels of hypoxia-inducible factor-1 α during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:309-14.
98. Perez AMDM, Peña L, Del Castilho N, Nieto AL. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. Department of Animal

- Pathology II, Veterinary School. Complutense University, Madrid, Spain. *Small Anim. Pract.* 2000;41:476.
99. van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *J Clin Oncol* 2005;23:1631-5.
 100. Kato Y, Asano K, Mogi T, Kutara K, Teshima K, Edamura K, et al. Clinical significance of circulating vascular endothelial growth factor in dogs with mammary gland tumors. *J. Vet. Med. Sci.* 2007;69:77-80.
 101. Thielemann A, Baszczuk A, Kopczyński Z, Kopczyński P, Grodecka-Gazdecka S. Clinical usefulness of assessing VEGF and soluble receptors sVEGFR-1 and sVEGFR-2 in women with breast cancer. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20:293-7.
 102. Jia D, Hasso SM, Chan J, Filingeri D, D'Amore PA, Rice L, et al. Transcriptional repression of VEGF by ZNF24: mechanistic studies and vascular consequences in vivo. *Blood* 2013;4:707-15.
 103. Kapahi R, Manjari M, Uppal MS, Singh NR, Sambyal V, Guleria K. Association of -2549 Insertion/Deletion Polymorphism of Vascular Endothelial Growth Factor with Breast Cancer in North Indian Patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013[Epub ahead of print]
 104. Duranyildiz D, Camlica H, Soydic HO, Derin D, Yasasever V. Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remain close to normal. *Breast.* 2009;18:26-29.
 105. El Tarhouny S, Seefeld M, Fan AX, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Comparison of serum VEGF and its soluble receptor sVEGFR1 with serum cell-free DNA in patients with breast tumor. *Cytokine.* 2008;44:65-69.
 106. Coskun U, Günel N, Toruner FB, Sancak B, Onuk E, Bayram O, et al. Serum leptin, prolactin and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with breast cancer. *Neoplasma* 2003;1:41-6.
 107. Perez-Rivas LG, Jerez JM, Fernandez-De Sousa CE, de Luque V, Quero C, Pajares B, Franco L, et al. Serum protein levels following surgery in breast cancer patients: a protein microarray approach. *Int J Oncol* 2012;6:2200-6.
 108. Berezov TT, Ovchinnikova LK, Kuznetsova OM, Karabekova ZK, Vorotnikov IK, Tuleuova AA, et al. Vascular endothelial growth factor in the serum of breast cancer patients. *Bull Exp Biol Med.* 2009;148:419-424
 109. Hodorowicz-Zaniewska D, Kibil W, Małek A, Szpor J, Kulig J, Sztefko K. Evaluation of serum concentrations of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in breast cancer patients. *Pol J Pathol* 2012;63:255-260.
 110. Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer.* 2007;97:978-85.
 111. Bachelot T, Ray-Coquard I, Menetrier-Caux C, Rastkha M, Duc A, Blay JY. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2003;88:1721-1726.
 112. Ece H, Cigdem E, Yuksel K, Ahmet D, Hakan E, Oktay TM. Use of oral antidiabetic drugs (metformin and pioglitazone) in diabetic patients with breast cancer: how does it effect serum Hif-1 alpha and 8Ohdg levels? *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;10:5143-8.
 113. Liang J, Qian Y, Xu D, Yin Q, Pan HJ. Serum Tumor Markers, Hypoxia-Inducible factor-1 α HIF-1 α and Vascular Endothelial Growth Factor, in Patients

- with Non- small Cell Lung Cancer Before and after Intervention. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:3851-3854.
114. Jia ZZ, Jiang GM, Feng YL. Serum HIF-1alpha and VEGF levels pre- and post-TACE in patients with primary liver cancer. *Chin Med Sci J.* 2011;26:158-162.
115. Marić P, Ozretić P, Levanat S, Oresković S, Antunac K, Beketić-Oresković L. Tumor markers in breast cancer--evaluation of their clinical usefulness. *Coll Antropol.* 2011;35:241-7.
116. Marchesi MC, Manuali E, Pacifico E, Ferri C, Romagnoli M, Mangili V, et al. Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study. *Vet Res Commun.* 2010;34 Suppl 1:S103-6.
117. Mohammed RA, Green A, EL-Shikh S, Paish EC, Ellis IO, Martin SG: Prognostic significance of vascular endothelial cell growth factors -A, -C and -D in breast cancer and their relationship with angio- and lymphangiogenesis. *Br J Cancer* 1997;96: 1092-1100.
118. Schito L, Rey S, Tafani M, Zhang H, Wong CC, Russo A, et al. Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:E2707-16.
119. Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1996;271:17771-8.
120. Levashova Z, Backer M, Hamby CV, Pizzonia J, Backer JM, Blankenberg FG. Molecular Imaging of Changes in the Prevalence of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Sunitinib-Treated Murine Mammary Tumors. *J Nucl Med.* 2010;51:959-66.
121. Ali MM, Janic B, Babajani-Feremi A, Varma NR, Iskander AS, Anagli J, et al. Changes in Vascular Permeability and Expression of Different Angiogenic Factors Following Anti-Angiogenic Treatment in Rat Glioma. *PLoS One.* 2010;5:e8727.

Apêndice

VII. APÊNDICE

Apêndice A: Protocolos de preparo das soluções.

¹ **BSA** PBS----- 12 mL
BSA----- 0,5 g

² **PBS** Cloreto de Sódio ----- 16,36 g
Fosfato de Sódio Dibásico ----- 2,1 g
Fosfato de Sódio Monobásico di-hidratado ----- 0,6 g
Água Destilada ----- 2000 mL

³ **Tampão citrato (pH 6,0)** Ácido Cítrico ----- 2,1 g
Água Destilada ---- 1000 mL

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) para regulação do pH do ácido cítrico

NaOH ----- 1,6 g
Água Destilada --- 20 ml

⁴ **CTFB** Água Destilada ----- 73 µL
4x Transcription Factor Binding Assay Buffer ----- 25 µL
Reagente A ----- 1 µL
300 mM de DTT ----- 1 µL

Solução de 300 mM de DTT

DTT ----- 0,5 g
Água Destilada --- 12,5 ml

⁵ **Tampão de Lavagem** Água Destilada ----- 2 L
Wash Buffer 400x ----- 5 mL
Polysorbate 20 ----- 1 mL

⁶ **ABB** Transcription Factor Antibody Binding Buffer ----- 3 mL
H₂O Destilada ----- 27 mL

Anexos

VIII. ANEXOS

ANEXO A - Modelo do Termo de Consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na resolução nº 714/2002)

Título da Pesquisa: “Detecção de potenciais marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas”

→ “Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação sérica e molecular do VEGF e do HIF-1”

→ “Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Expressão dos receptores MT1 e MT2 e ação da melatonina em cultura primária”

Pesquisadores Responsáveis: Prof^a. Dra. Debora A. P. C. Zuccari – Coordenadora / Marina Gobbe Moschetta – Mestranda / Juliana Ramos Lopes – Mestranda.

Para obter maior conhecimento dos mecanismos envolvidos no câncer de mama em cadelas, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto oferecer novas possibilidades de tratamento e de melhora na qualidade de vida dos nossos animais de estimação.

- A. O estudo tem como objetivo avaliar o papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator induzido por hipóxia (HIF-1) em cadelas em diferentes momentos, além de avaliar a ação da melatonina em cultivo celular; a fim de verificar a relação entre os valores e utilizá-los como marcadores de crescimento tumoral e no surgimento de metástases.
- B. Será coletada uma amostra sanguínea do animal (3 mL) no momento da cirurgia e posteriores coletas serão feitas: um mês após a cirurgia, seis meses após a cirurgia e 12 meses após a cirurgia.
- C. Após a cirurgia para retirada do tumor será cortado parte deste material, um pedacinho que será enviado ao laboratório para diagnóstico histopatológico. Não haverá mudança na técnica cirúrgica para esta coleta.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador sobre a utilização para estudo de amostra sanguínea e um fragmento da lesão tumoral (pedacinho de 1 cm do tumor) a ser retirado durante o procedimento cirúrgico, já estipulado no tratamento, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo e me comprometo a manter contato com o grupo para as 3 coletas subseqüentes em 1 mês, 6 meses e 12 meses após a cirurgia.

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão. E comprometo-me a conceder a coleta de amostras sanguíneas da minha cadela durante os quatro períodos da

pesquisa e ainda, comprometo-me a manter o pesquisador informado no caso de mudança de endereço ou telefone.

Nome do(a) proprietário(a):

Nome da cadela:

Endereço residencial: _____ **nº** _____

Bairro: _____ **Telefone residencial:** _____ **Celular:** _____

Data:...../...../...../ **Assinatura:**.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do(a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Inscrição no Conselho Regional:

Profa. Dra. Debora A.P.C. Zuccari – Laboratório de Investigação Molecular no Câncer – LIMC.
Av. Brigadeiro Faria Lima, nº 5416 FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
São José do Rio Preto, SP - CEP 15090-000
Fone: (17) 3201-5885
e-mail: debora.zuccari@famerp.br

ANEXO B - Modelo da Ficha Clínica do animal

FICHA CLÍNICA

Nome da cadela: _____

Idade: _____

História Clínica: Recidiva Metástase**Tempo de evolução:** 1 mês () até 6 meses () mais de 6 meses ()**Número de nódulos:** Único () Múltiplos ()**Dimensões do tumor (T):** ____ x ____ x ____ (cm)

T0: ausência do tumor primário evidente ou ausência de recidiva

T1: < 3 cm

T2: entre 3 e 5 cm

T3: > 5 cm

Envolvimento de linfonodos regionais: _____

N0: sem envolvimento evidente

N1: envolvimento unilateral

N1a: móveis

N1b: fixos

N2: envolvimento bilateral

N2a: móveis

N2b: fixos

Quanto à confirmação histológica de envolvimento de linfonodos: (-) ou (+)

Metástase à distância: _____

M0: sem metástases evidentes

M1: metástases à distância incluindo linfonodos não regionais

Mx: impossível avaliar existência de metástases

Características do tumor:

Ulceração: sim () não ()

Vascularização: moderada () abundante ()

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA

FAMERP Autarquia Estadual, Av. Brig. Faria Lima 5416 CEP 15090.000 Tel. 3201-5700 S.J.Rio Preto/ SP

DELIBERAÇÃO CEEA Nº 008/2010

A Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEEA/FAMERP, em reunião desta data analisou o projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação sérica e molecular do VEGF e do HIF-1” (Protocolo FAMERP nº 5230/2010)” sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi **aprovado** por essa Comissão.

Atenção: Ao final do estudo o pesquisador deverá preencher o Formulário do Relatório Final e enviar ao CEEA.

São José do Rio Preto, 27 de setembro de 2010.

Prof.^a Dra. Glória Elisa Florido Mendes

Vice-Presidente da CEEA

FAMERP