



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

José Henrique Musumeci Ferreira

Valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8
em macerado tumoral mamário canino

São José do Rio Preto
2014

José Henrique Musumeci Ferreira

Valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e
IL-8 em macerado tumoral mamário canino

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso 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
2014

José Henrique Musumeci Ferreira

Valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e
IL-8 em macerado tumoral mamário canino

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

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

2º Examinador: Profa. Dra. Glória Elisa Florido Mendes

3º Examinador: Profa. Dra. Ana Silvia Dagnone

Suplentes: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

Profa. Dra. Thaís Santana Gastardelo Bizotto

São José do Rio Preto, 01/09/2014

Sumário

Sumário

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas e quadros.....	x
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
I. INTRODUÇÃO.....	2
1. Neoplasia mamária.....	2
2. Microambiente tumoral.....	4
3. Mediadores angiogênicos: HIF-1e VEGF.....	5
4. Mediadores inflamatórios: Interleucina-8 (IL-8).....	9
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
1. Considerações éticas.....	13
2. Amostras.....	13
2.1. Colheita das amostras.....	13
2.2. Caracterização Histopatológica das amostras.....	13
3. Processamento das amostras.....	14
3.1. Obtenção do tecido tumoral.....	14
3.2. Preparação dos fragmentos tumorais para análise histopatológica.....	15
3.3. Diagnóstico histopatológico.....	15
3.4. Preparação dos fragmentos tumorais para o ensaio imunoenzimático (ELISA)..	16
4. ELISA.....	16
4.1. Proteína HIF-1 α	16
4.2. Proteína VEGF.....	17
4.3. Proteína IL-8.....	19
5. Análise estatística.....	20
III. RESULTADOS.....	23
1. Dados clínicos.....	23
2. HIF-1 α	26
3. VEGF.....	30
4. IL-8	34
IV. DISCUSSÃO.....	41
V. CONCLUSÕES.....	50
VI. REFERÊNCIAS.....	52
VII. APÊNDICE.....	61
VIII. ANEXOS.....	63

Dedicatória

A Deus por todas as coisas boas e ruins que tive o privilégio de desfrutar com vida e saúde.

A minha esposa Janaina pelo apoio durante toda a jornada.

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre investiram e se dedicaram para que eu pudesse estudar. Dedico aos meus avós que sempre incentivaram a enfrentar os desafios com paciência e perseverança, sempre lembrando a importância dos amigos e da família. Me ajudaram a enxergar a grande importância de sustentar objetivos nobres semeando a bondade e a justiça por onde passaram.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Debora Zuccari, pela oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Agradeço pelo apoio e pela confiança depositada em mim, e pelos conhecimentos que me fizeram aprender e crescer muito ao longo desses anos.

Aos companheiros de laboratório, Larissa B. Maschio, Naiane do N. Gonçalvez, Lívia C. Ferreira, Juliana R. Lopes, Thaiz F. Borin e Jucimara, Colombo, principalmente a Bruna Victorasso Jardim-Perassi, Gustavo R. Martins, Bruna V. Jardim, Gabriela B. Gelaleti, Marina Gobbe Moschetta e Camila Leonel pela ajuda imprescindível e por tudo que fizeram por mim.

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.

Agradeço a todos os proprietários que prontamente permitiram o contato com seus animais tornando possível a pesquisa.

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

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da ativação da angiogênese a partir de células quiescentes.....	5
Figura 2. Ativação do HIF-1 α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia).....	7
Figura 3. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores.....	8
Figura 4. Representação da associação entre os níveis de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle.....	26
Figura 5. Representação da associação entre a concentração de HIF-1 α nos tumores mamários de cadelas e idade.....	27
Figura 6. Representação da associação entre a concentração de HIF-1 α nos tumores mamários de cadelas e presença de metástase.....	27
Figura 7. Representação da associação entre a concentração de HIF-1 α nos tumores mamários de cadelas e censura.....	28
Figura 8. Valor de corte dos níveis de HIF-1 α , estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC.....	29
Figura 9. Sobrevida global das cadelas com altos e baixos níveis de HIF-1 α	30
Figura 10. Representação da associação entre os níveis de VEGF em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle.....	30
Figura 11. Representação da associação entre a concentração de VEGF nos tumores mamários de cadelas e idade.....	31
Figura 12. Representação da associação entre a concentração de VEGF nos tumores mamários de cadelas e estadiamento clínico.....	32
Figura 13. Representação da associação entre a concentração de VEGF nos tumores mamários de cadelas e censura.....	32

Figura 14. Valor de corte dos níveis de VEGF, estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC.....	32
Figura 15. Sobrevida global das cadelas com altos e baixos níveis de VEGF.....	34
Figura 16. Representação da associação entre os níveis de IL-8 em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle.....	34
Figura 17. Representação da associação entre a concentração de IL-8 nos tumores mamários de cadelas e idade.....	35
Figura 18. Representação da associação entre a concentração de IL-8 nos tumores mamários de cadelas e diferentes períodos de evolução tumoral.....	36
Figura 19. Representação da associação entre a concentração de IL-8 nos tumores mamários de cadelas e censura ($p=0,03$).....	36
Figura 20. Valor de corte dos níveis de Il-8, estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC.....	37
Figura 21. Sobrevida global das cadelas com altos e baixos níveis de IL-8.....	37

Lista de tabelas e quadros

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Características clínico-patológicas das cadelas do grupo teste.....	24
Tabela 2: Associação entre a expressão proteína de HIF-1 α , VEGF e IL-8 e os parâmetros clínico-patológicos das cadelas do grupo de estudo.....	25
Tabela 3. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação da concentração de HIF-1 α e alguns fatores prognóstico com risco de óbito.....	38
Tabela 4. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação da concentração de VEGF e alguns fatores prognóstico com risco de óbito.	38
Tabela 5. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação da concentração de IL-8 e alguns fatores prognóstico com risco de óbito.	39
Tabela 6. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação das concentrações de HIF-1 α , VEGF e IL-8 com risco de óbito.....	39

Lista de abreviaturas e símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	micro-grama
µL	micro-litro
µm	Micrômetros
4-PL	<i>Four parameter logistic</i>
ABB	<i>Antibody Binding Buffer</i>
AFIP	<i>Armed Forces Institute of Pathology</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CO₂	Fórmula química do gás carbônico
CTFB	<i>Complete Transcription Factor Binding</i>
DO	Densidade Óptica
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
g	Gramas
H₂O	Fórmula química da água
H₂O₂	Fórmula química do peróxido de hidrogênio
H₂SO₄	Fórmula química do ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IC	Intervalo de confiança
IL-8	Interleucina-8
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros

ng	Nanograma
nm	Nanômetros
NO	Fórmula química do óxido nítrico
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
pg	Picograma
pVHL	<i>Protein Von Hippel-Lindau</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
S.E.M.	Desvio Padrão
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T= tumor, N=linfonodo (do inglês node), M= metástase
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Resumo

RESUMO

Introdução: As neoplasias mamárias são o tipo mais comum de tumor na espécie canina. Algumas proteínas exercem importante papel na progressão tumoral e portanto, são candidatos marcadores de prognóstico. Durante o crescimento tumoral, o fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 α) ativa a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo a angiogênese. A interleucina-8 (IL-8) é uma citocina pró-inflamatória e pró-angiogênica e tem sido associada à progressão tumoral.

Objetivos: Avaliar o valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 no tecido tumoral em cadelas com neoplasia mamária, relacionando-os com os parâmetros clínico-patológicos, evolução clínica e sobrevida. **Material e Métodos:** As concentrações das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 foram avaliadas pelo método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent Assay*) no macerado tumoral de 25 cadelas com neoplasia mamária e amostras controle e comparadas estatisticamente. **Resultados:** Os níveis de HIF-1 α , VEGF e IL-8 foram maiores em cadelas com idade superior a 10 anos e que vieram a óbito ($p < 0,05$). Além disso, concentrações de HIF-1 α foram elevadas nos tumores de cadelas que desenvolveram metástase ($p = 0,04$), enquanto os níveis de VEGF foram maiores em tumores com estadiamento clínico III e IV ($p = 0,03$), e de IL-8 em tumores com evolução tumoral maior que seis meses ($p = 0,03$). Ainda, níveis elevados de HIF-1 α , VEGF e IL-8 também foram relacionados com menor tempo de sobrevida global ($p < 0,05$). **Conclusões:** Altas concentrações de HIF-1 α , VEGF e IL-8 estão associadas com características de pior prognóstico, sugerindo que a avaliação dessas proteínas no macerado tumoral possui importante valor prognóstico.

Palavras-chave: Marcadores tumorais, Angiogênese, Microambiente tumoral, ELISA, HIF-1 α , VEGF, IL-8.

Abstract

ABSTRACT

Introduction: Mammary neoplasms are the most common type of tumor in dogs. Some proteins play an important role in tumor progression, thus are candidate prognosis markers. During tumor growth, the transcription factor induced by hypoxia (HIF-1 α) activates the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), promoting angiogenesis. Interleukin-8 (IL-8) is a pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokine and has been associated with tumor progression. **Objectives:** To evaluate the prognostic value of HIF-1 α , VEGF and IL-8 proteins in tumor tissue in dogs with mammary tumors, correlating them with clinicopathological parameters, clinical outcome and survival. **Material and Methods:** The concentrations of HIF-1 α , VEGF and IL-8 proteins were evaluated by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent) in macerated tumor of 25 bitches with mammary tumors and control samples and compared statistically. **Results:** The levels of HIF-1 α , VEGF and IL-8 were higher in dogs over the age of 10 years and that had died ($p < 0.05$). Moreover, HIF-1 α concentrations were elevated in the tumors of dogs who developed metastases ($p = 0.04$), while VEGF levels were highest in tumors with clinical stages III and IV ($p = 0.03$) and IL-8 tumors in tumor with development greater than six months ($p = 0.03$). Still, high levels of HIF-1 α , VEGF and IL-8 were also related to shorter overall survival ($p < 0.05$). **Conclusions:** High levels of HIF-1 α , VEGF and IL-8 are associated with features of poor prognosis, suggesting that the assessment of these proteins in tumor macerated has important prognostic value.

Keywords: Tumor markers, angiogenesis, tumor microenvironment, ELISA, HIF-1 α , VEGF, IL-8.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Neoplasia mamária

O câncer de mama é uma grande preocupação mundial confirmada pelas altas taxas de incidência e mortalidade, sendo a neoplasia mais comum entre as mulheres e a quinta maior causa de morte relacionada ao câncer. ⁽¹⁾ A Organização Mundial da Saúde estima que, por ano, ocorram mais de 1.050.000 novos casos de câncer de mama em mulheres em todo o mundo. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimaram a ocorrência de 52.680 novos casos em 2012, sendo que desses, 12.852 evoluíram para óbito. ⁽²⁾ Para o ano de 2014, a estimativa é de 57.120 novos casos de câncer de mama. ⁽¹⁾

A alta incidência dessa neoplasia é também observada em cadelas, representando aproximadamente 50 % de todas as neoplasias que acometem cães, sendo predominantes os tumores de caráter maligno. ⁽³⁻⁶⁾ Os tumores mamários em fêmeas caninas apresentam características epidemiológicas, patológicas e bioquímicas similares aos carcinomas mamários em mulheres, ⁽²⁾ entretanto, têm incidência três vezes maior. ^(4, 7) Devido às muitas semelhanças compartilhadas por seres humanos e cães, os tumores mamários em cadelas prestam-se como modelos apropriados para compreender vários aspectos da carcinogênese nestas espécies. ^(2, 8)

A avaliação dos parâmetros clínicos e patológicos com significado prognóstico e terapêutico nas neoplasias de mama é um valioso campo de estudo na medicina veterinária. ⁽⁹⁾ A avaliação morfológica em conjunto com alterações moleculares do tumor pode auxiliar no diagnóstico das neoplasias, bem como na determinação da

evolução clínica. ^(6, 10, 11) Dessa forma, cresce o interesse pela busca de novos marcadores tumorais que possam auxiliar na avaliação mais precisa do prognóstico. ⁽⁹⁾

Marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cuja presença ou alterações em suas concentrações estão relacionadas com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. ⁽¹²⁾ Esses marcadores são, em sua maioria, proteínas, enzimas e hormônios que podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos, moleculares ou imuno-histoquímicos nos tecidos ou no sangue. ⁽¹²⁾ Possuem vantagens no diagnóstico precoce do câncer, uma vez que refletem a dinâmica dos estados fisiológico e patológico antes da detecção dos sintomas clínicos. ^(13, 14)

Na última década, pesquisadores indicaram uma crescente variedade de marcadores moleculares a serem utilizados em conjunto com os marcadores morfológicos e histopatológicos presentes nos tumores, com o intuito de obter um prognóstico mais confiável e ampliar as estratégias futuras no tratamento do carcinoma mamário. ^(10, 15-17)

A detecção de marcadores prognósticos no tecido tumoral tem sido utilizada em conjunto com a avaliação histopatológica convencional, como uma ferramenta crescente no diagnóstico de tumores mamários. ⁽¹⁸⁻²⁰⁾ Na patologia humana, a detecção de marcadores tumorais é rotineiramente utilizada para avaliação do prognóstico e seleção do tratamento mais adequado para o paciente. ⁽²¹⁾ Em cadelas com neoplasia mamária, a utilização de marcadores não é uma prática frequente na rotina clínica, embora a busca por biomarcadores de diagnóstico e prognóstico venha aumentando progressivamente nos últimos 15 anos. ⁽⁶⁾ No entanto, é importante ressaltar que o estudo de fatores prognósticos clássicos ou novos frequentemente apresenta resultados conflitantes na

literatura, tornando necessária a busca por outros fatores que possam predizer de forma mais precisa o prognóstico de pacientes com câncer de mama. ⁽²²⁾

2. Microambiente tumoral

Os tumores sólidos são reconhecidos por um microambiente complexo que envolve interações de diferentes componentes celulares e moleculares. ^(23, 24) Sabe-se que processos como a angiogênese e inflamação são componentes críticos do microambiente tumoral.

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da proliferação e migração de células endoteliais preexistentes. Estudos recentes têm demonstrado que outros mecanismos também contribuem com a formação de novos vasos no tumor, como a vasculogênese, até então um processo considerado restrito à fase embrionária. ^(25, 26) Ao contrário da angiogênese, a vasculogênese consiste na diferenciação de células progenitoras, os angioblastos, em células endoteliais maduras. ⁽²⁷⁻³⁰⁾ A formação de novos vasos sanguíneos no tecido tumoral visa o fornecimento de nutrientes e oxigênio permitindo a proliferação das células e conseqüente crescimento e progressão do tumor. ^(31, 32) Além disso, permitem a retirada do gás carbônico (CO₂) e dos resíduos metabólicos, e representam uma importante via de disseminação metastática. ^(33, 34)

Com relação a inflamação, sabe-se que muitos tipos de câncer surgem a partir de sítios de infecção e inflamação crônica, destacando que o microambiente tumoral, em grande parte, é controlado por células inflamatórias. Essas células têm participação importante no processo neoplásico, promovendo a proliferação, migração e sobrevivência celular, ⁽³⁵⁾ além de produzir ou ativar fatores anti e pró-angiogênicos.

Dessa forma, as atividades coordenadas destes elementos e a interação desses processos no microambiente tumoral podem ter importantes implicações clínicas. ⁽³⁶⁾

3. Mediadores angiogênicos: Fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF-1 α) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O processo angiogênico é regulado por inúmeros fatores pró e anti-angiogênicos, no entanto, durante a carcinogênese estímulos fisiológicos podem levar ao aumento dos fatores pró-angiogênicos e diminuição dos anti-angiogênicos, resultando na ativação do “interruptor angiogênico” (*angiogenic switch*). Assim, as células endoteliais quiescentes passam a responder a estímulos de proliferação e migração para formação de novos vasos ⁽³⁷⁾ (Figura 1).

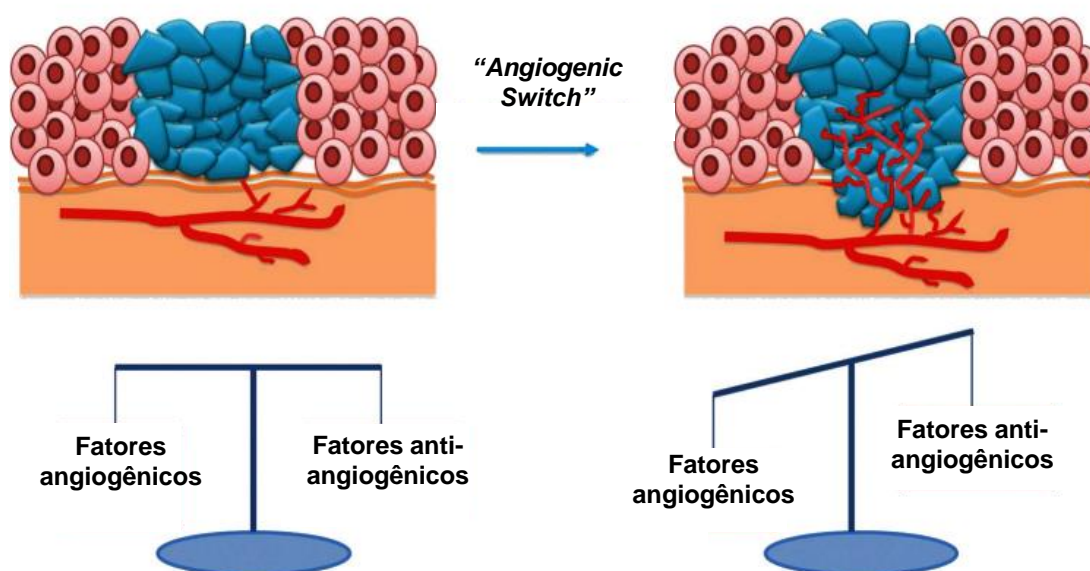


Figura 1: Representação da ativação da angiogênese a partir de células quiescentes.

Adaptado de Gelao et al. ⁽³⁰⁾.

Durante seu crescimento, o tumor pode alcançar aproximadamente 1-2 mm³ antes que suas demandas metabólicas sejam restritas devido ao limite de difusão de oxigênio e nutrientes no local. ⁽³⁸⁾ A baixa oxigenação é caracterizada como hipóxia e pode ocorrer devido à proliferação descontrolada das células e rápido crescimento do tumor, além da perfusão inadequada em parte do tecido resultante da estrutura caótica dos novos vasos sanguíneos formados. ⁽³⁹⁻⁴¹⁾

De acordo com a intensidade, a hipóxia pode resultar em apoptose, ou induzir respostas adaptativas de sobrevivência celular. ⁽⁴²⁾ Assim, ao contrário das células normais, para manter a sobrevivência em situações de hipóxia, as células tumorais são capazes de promover mecanismos adaptativos, como a indução do HIF-1. ⁽²⁹⁾

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodímero que consiste de duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , ⁽⁴³⁾ desempenhando um papel importante no crescimento normal e desenvolvimento fisiopatológico da isquemia, inflamação e do câncer. ⁽⁴⁴⁾ O subtipo 1 α tem importância funcional em tumores de mama, ⁽²⁷⁾ sendo um importante modulador de células tumorais para a adaptação a microambientes hipóxicos já que o aumento de sua expressão promove a angiogênese. ⁽⁴⁵⁾

Em mamíferos a subunidade HIF-1 α é codificada por três genes: HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α . ^(46,47) 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 sólidos, como de mama. ⁽⁴⁸⁾

Em situações normais de oxigênio, o HIF-1 α é reconhecido pela proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL), sofrendo ao final degradação proteossomal. No entanto, em situações de hipóxia, o pVHL se liga ao radical NO (óxido nítrico) e o HIF-1 α não é reconhecido. Nesse caso, o HIF-1 α é estabilizado e

induz a expressão de genes de resposta à hipóxia, que por sua vez estimulam o processo de angiogênese⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾ (Figura 2).

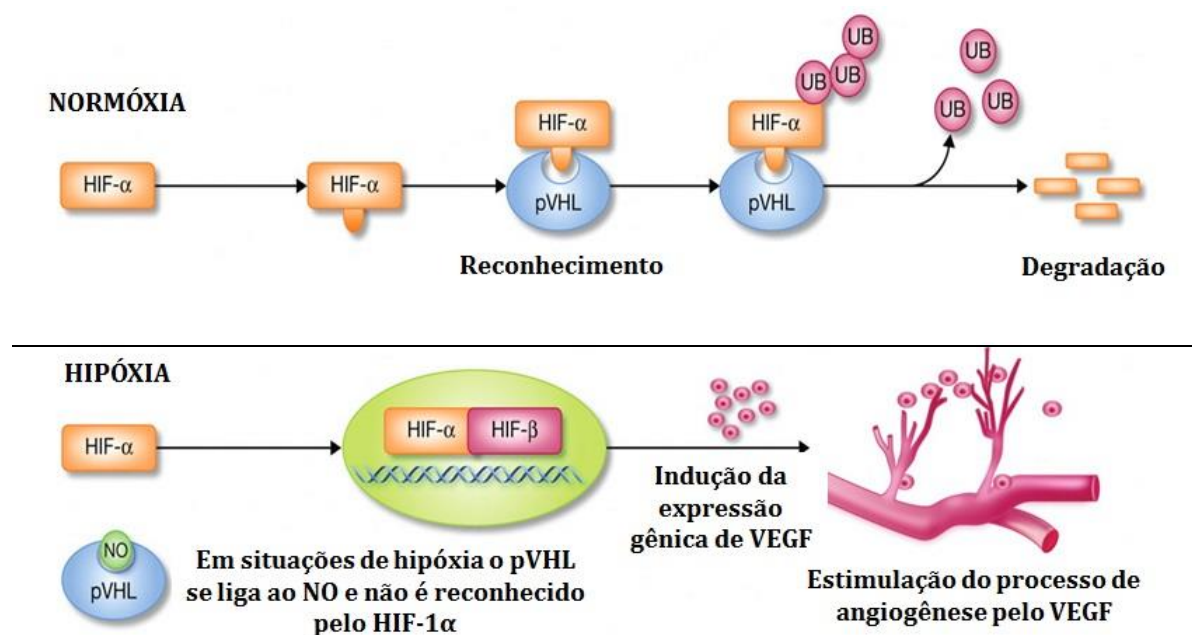


Figura 2. Ativação do HIF-1 α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia). Adaptado de Rahimi.⁽⁵²⁾

O HIF-1 α pode regular mais de 100 genes envolvidos nos processos da eritropoiese, metabolismo do ferro e da glicose, proliferação celular, apoptose e angiogênese.⁽⁴⁷⁾ Em condições de hipóxia, o principal alvo do HIF-1 α é o fator pró-angiogênico VEGF.⁽⁴⁷⁾

O VEGF é um potente mitógeno que atua em diferentes etapas do processo angiogênico, promovendo o aumento da permeabilidade vascular, estimulação da migração, proliferação e invasão de células endoteliais.^(48, 50, 53, 54) Esse fator foi primeiramente descrito em células endoteliais e, portanto, denominado “fator de crescimento endotelial vascular”, no entanto, o VEGF pode exercer ação mitogênica em outros tipos celulares.⁽⁵⁵⁾ A família VEGF é composta por cinco isoformas

denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF), ^(28, 56) os quais ligam-se a receptores específicos do tipo tirosina quinase, promovendo uma cascata de eventos intracelulares. ^(45, 51)

Cada isoforma pode ativar um ou mais receptores conhecidos, como VEGFR1 localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, VEGFR2 encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR3 localizado predominantemente no endotélio linfático. ^(52, 55) O VEGF-A se liga a dois receptores específicos, o VEGFR1 e o VEGFR2 enquanto o VEGF-B e PLGF são reconhecidos apenas pelo receptor VEGFR1. O VEGF-C e VEGF-D se ligam ao VEGFR2 e também são reconhecidos pelo VEGFR3 ⁽⁴⁶⁾ (Figura 3).

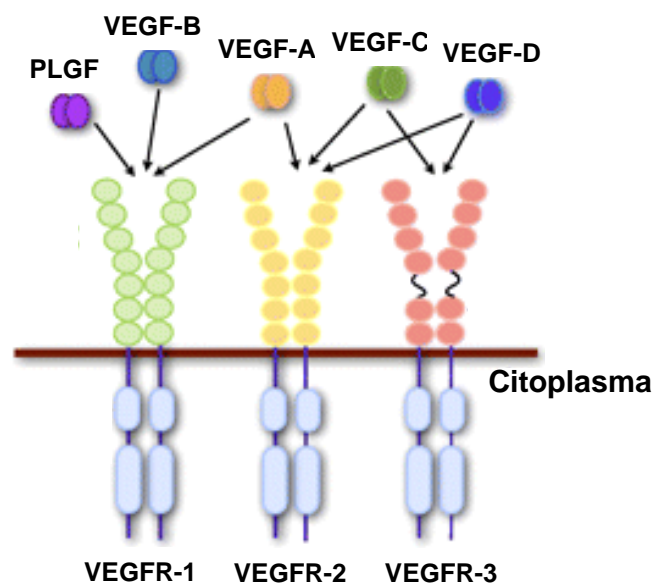


Figura 3. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores. Adaptado de Almodovar et al. ⁽⁵⁷⁾

A ligação entre o VEGF-A e VEGFR2 é considerada o mais importante passo do processo de angiogênese. ^(51, 52, 55) O VEGF-A é produzido pelas células tumorais em situações de hipóxia e quando liberado se liga ao receptor VEGFR2 promovendo a

angiogênese através da sua capacidade de estimular o crescimento, migração e invasão de células endoteliais ⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾ contribuindo para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases ⁽²⁹⁾. A ligação de VEGF-C com VEGFR3 está envolvida no processo de linfangiogênese. ⁽⁶²⁾

Todas as principais isoformas de VEGF foram identificadas em cães, sendo os seus receptores também idênticos em seres humanos. A expressão do VEGF em tumores caninos é similar ao observado em neoplasias humanas. ⁽⁶³⁾ Atualmente, o aumento da expressão tanto de HIF-1 α como de VEGF em tumores mamários de mulheres e cadelas tem sido relacionado com comportamento tumoral agressivo e pior prognóstico. ^(64,65)

A superexpressão do HIF-1 α relaciona-se com pior prognóstico das pacientes com câncer de mama, implicando na resistência ao tratamento. ^(44, 55) O grau de progressão do tumor e características de prognóstico ruim, tais como crescimento, aumento da densidade microvascular e desenvolvimento de metástases se correlacionam diretamente com a expressão do VEGF. ^(58, 59) Assim, a superexpressão do HIF-1 α e VEGF resulta no aumento da angiogênese associando-se com a progressão maligna e com o aumento do potencial invasivo e metastático das células tumorais. ⁽⁶³⁻⁶⁶⁻⁶⁹⁾ Na oncologia veterinária, o papel da angiogênese e sua correlação com o comportamento biológico dos tumores mamários é ainda pouco documentada.

4. Mediadores inflamatórios: Interleucina-8 (IL-8)

O crescimento do tumor pode ser controlado pelo sistema imunológico e sabe-se que as citocinas são importantes fatores nesse processo. ⁽⁹⁾ Tais citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas por um grande número de células e

tecidos, bem como aqueles associados à processos inflamatórios, sistema imune e tumores, os quais regulam funções celulares autócrinas e parácrinas.⁽⁷⁰⁾ São mediadoras intercelulares envolvidas na patogênese do câncer, e estão incluídas como marcadores de diagnóstico e prognóstico de doenças não-invasivas, bem como no seguimento da resposta a tratamentos específicos.⁽⁷¹⁾ Algumas células tumorais não só regulam a expressão de citocinas para o recrutamento de células inflamatórias, como também usam esses fatores para promover o crescimento e progressão do tumor.⁽²⁷⁾

Para que ocorra a transformação neoplásica, e o subsequente crescimento do tumor, invasão e desenvolvimento de metástases, há a necessidade de um ambiente pró-angiogênico que é obtido em consequência do desequilíbrio entre os fatores anti- e pró-angiogênicos.⁽⁷²⁾ A família das quimiocinas CXC é o único grupo de citocinas conhecidas pelo comportamento diferencial na regulação da angiogênese. Vários membros das quimiocinas CXC são potentes promotores da angiogênese, enquanto outros inibem esse processo.⁽²⁸⁾

A interleucina-8 (IL-8), quimiocina da família CXC produzida por células sanguíneas e por vários tecidos, é conhecida como uma citocina pró-inflamatória e pró-angiogênica e tem sido associada à progressão tumoral, e conseqüentemente com o prognóstico ruim, indicando baixa sobrevida em muitos tipos de câncer.⁽⁴⁹⁾ É um importante quimioatrativo responsável pelo recrutamento de leucócitos e neutrófilos e um indutor da proliferação e angiogênese tumoral,⁽⁷³⁾ agindo como um fator mitogênico e angiogênico.⁽⁷⁴⁾ A IL-8 tem participação na neovascularização do câncer induzindo resposta migratória de células endoteliais através da interação com seus receptores CXCR1 e CXCR2.⁽⁷⁵⁾ A secreção de IL-8 pelas células tumorais pode promover a invasão, migração celular e o processo metastático, induzindo a infiltração de

neutrófilos e produção de fatores de crescimento por macrófagos associados ao tumor.
(76)

A alta expressão de IL-8 é frequentemente observada em diversos tipos tumorais e sua relação com a proliferação, angiogênese e sobrevivência celular tem sido demonstrada em cânceres humanos. ⁽⁷⁶⁾ Níveis elevados de IL-8 foram associados com a progressão e recorrência da doença no câncer de próstata, pulmão, estômago e mama. ⁽⁷²⁾ Além disso, elevados níveis séricos de IL-8 foram correlacionados com características de progressão e recorrência tumoral em cadelas com câncer de mama, sugerindo que esta citocina tem um potencial valor prognóstico também nessa espécie.
(7)

Nesse contexto, diante da importância do tema e escassez de estudos envolvendo a mensuração dessas proteínas no microambiente tumoral em cadelas, o presente estudo teve como objetivo avaliar o valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 em cadelas com neoplasia mamária, relacionando-os com os parâmetros clínico-patológicos, a evolução clínica e sobrevida. Desse modo, os objetivos específicos foram:

- Verificar a concentração proteica de HIF-1 α , VEGF e IL-8 em tumores mamários de cadelas em relação ao controle (tecido mamário sem neoplasia);
- Correlacionar os dados entre os grupos e com as características clínico-patológicas, evolução clínica e sobrevida das pacientes.

Material e Métodos

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Considerações éticas

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 19/2014) (Anexo A). 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 e assinaram o termo de consentimento informado (Anexo B). O médico veterinário responsável preencheu a ficha clínica do animal (Anexo C) e os dados foram plotados em tabela para posterior análise.

2. Amostras

2.1. Colheita das amostras

Foram colhidos fragmentos tumorais de 25 cadelas com neoplasia mamária (grupo de estudo) e três cadelas hígdas (grupo controle), atendidas nas clínicas veterinárias de São José do Rio Preto e região durante os anos de 2011 e 2014. Os critérios de exclusão para as cadelas do grupo controle foram rigorosamente seguidos, sendo incluídas no grupo apenas cadelas sem histórico de doença inflamatória e procedimento cirúrgico em período anterior próximo.

2.2. Caracterização Histopatológica das amostras

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 foi classificado de acordo com Misdorp et al., 1999⁽²⁴⁾. Os parâmetros utilizados para o estadiamento clínico estão de acordo com o sistema TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase) estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores mamários caninos⁽⁷⁷⁾.

As cadelas do grupo de estudo foram avaliadas com relação às características clínico-patológicas (tempo de evolução, 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 apenas cadelas que morreram pela doença foram incluídas no estudo.

3. Processamento das amostras

3.1. Obtenção do tecido tumoral

Após a exérese tumoral foi selecionado um fragmento tumoral de pelo menos um cm de diâmetro, armazenado em tubo Falcon de 15 mL contendo solução

estabilizadora de RNA – RNA *later* (Life Technologies®). Em seguida, o material foi transportado até o Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC – FAMERP), identificado e armazenado em freezer a -80°C para posterior realização da técnica de ELISA.

3.2. Preparação dos fragmentos tumorais para análise histopatológica

O fragmento tumoral, armazenado em solução de formol a 10% foi processado, incluído em parafina seguiu procedimento de rotina, microtomia e coloração com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histopatológica.

3.3. Diagnóstico histopatológico

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

A classificação utilizada para o diagnóstico histopatológico foi a de Misdorp⁽²⁴⁾ pela AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*) e os parâmetros utilizados para

estadiamento clínico seguiram o sistema TNM (tamanho, envolvimento linfonodal, metástase) ⁽⁷⁸⁾ estabelecido pela OMS para tumores mamários caninos. ⁽⁷⁷⁾ Foi estabelecido o tamanho tumoral (T) - T1: < 3 cm - T2: entre 3 e 5 cm - T3: > 5 cm; 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.

3.4. Preparação dos fragmentos tumorais para realização do ensaio imunoenzimático (ELISA)

O tecido tumoral foi preparado com adição de tampão (100 mM Tris, pH 7,4; 100 mM NaCl; 1% de Triton X-100; 1 mM EDTA) e armazenado a -20°C. Imediatamente antes do uso, o tampão foi suplementado com 1 mM de PMSF e inibidor de protease. O tecido foi homogeneizado mecanicamente, centrifugado a 1850 g por dez minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20°C.

4. ELISA

4.1. Proteína HIF-1 α

Para a realização da técnica de ELISA com o *kit* HIF-1 α *Transcription Assay*, o *Buffer* (*Transcription Factor Binding Assay Buffer* – CTFB¹) contendo 7008 μ L de água ultra-pura, 96 μ L de reagente A e 2400 μ L de *4x-transcription factor binding assay buffer*, disponíveis no *kit*, e 96 μ L de dithiothreitol (DTT) a 300 mM, totalizando 9.600 μ L de CTFB foram preparados. Em seguida, preparou-se o tampão de lavagem²,

contendo 5 mL de tampão de lavagem concentrado (*Wash Buffer Concentrate* – 400x) e 1 mL de Polysorbate 20, disponíveis no kit, e 2000 mL de água ultra-pura, totalizando 2006 mL. No início da reação foram adicionados o controle positivo, constituído por CTFB e *Transcription Factor HIF-1 α Positive Control*, o branco (CTFB) e as amostras em seus respectivos poços. A placa foi incubada por uma hora em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada (programação do chip da lavadora em cinco lavagens com 200 μ L de tampão de lavagem) e em seguida adicionados em cada poço, exceto no branco, 100 μ L do anticorpo primário do HIF-1 α diluído 1:100 em *Antibody Binding Buffer* 1X (ABB³ 1X) e novamente, a placa foi incubada por uma hora em temperatura ambiente. Repetida a lavagem (cinco lavagens com 200 μ L de tampão de lavagem), foram adicionados em cada poço, exceto no branco, 100 μ L do anticorpo secundário do HIF-1 α diluído 1:100 em ABB 1X. A placa foi novamente incubada por uma hora em temperatura ambiente e realizada a lavagem (cinco lavagens com 200 μ L de tampão de lavagem) em seguida, foram adicionados 100 μ L da solução substrato (*Transcription Factor Developing Solution*) em todos os poços e incubados por 15 a 45 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz. Para finalizar a reação, foram adicionados 100 μ L da solução de parada e realizada a leitura no leitor de ELISA a 450 nm. A unidade de medida da concentração é dada em porcentagem com relação às amostras controle.

4.2. Proteína VEGF

Para a realização da técnica de ELISA com o kit *Quantikine Canine VEGF* (R&D Systems Minneapolis, MN), os padrões e solução substrato com reagente diluente RD6U foram reconstituídos. O tampão de lavagem foi preparado com 20 mL

de tampão de lavagem concentrado, disponível no kit, e 480 mL de água destilada, totalizando 500 mL de tampão de lavagem. A solução padrão VEGF foi reconstituída com 1 mL do reagente diluente RD6U ficando na concentração de 2500 pg/mL, em seguida, foram distribuídos 500 µL desta solução em seis *Eppendorfs*, já contendo 500 µL de reagente diluente RD6U, afim de produzir uma curva com sete diluições diferentes da solução padrão VEGF. No início da reação foram adicionados 100 µL do reagente diluente RD1W em cada poço da placa. Em seguida foram adicionados os padrões, o branco (Calibrador diluente RD6U) e as amostras em seus respectivos poços e a placa foi incubada por duas horas em temperatura ambiente. Após este período, a placa foi lavada (programação do *chip* da lavadora em três lavagens com 300 µL de tampão de lavagem) e em seguida adicionados 200 µL do conjugado VEGF, novamente, incubados por duas horas em temperatura ambiente. Repetida a lavagem (três lavagens com 300 µL de tampão de lavagem), foram adicionados 200 µL de solução substrato (composta por 10 mL de reagente A mais 10 mL de reagente B) em cada poço das amostras e dos padrões e a placa foi incubada por 25 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Para finalizar a reação, foram adicionados 50 µL da solução de parada e realizada a leitura no leitor de ELISA a 450 nm.

O cálculo da densidade óptica (DO) foi estabelecido através da curva de ajuste *four parameter logistic* (4-PL) pelo software SkanIt for Multiskan FC 2.5.1. A intensidade da coloração foi proporcional à concentração do antígeno VEGF, expressos em pg/mL.

4.3. Proteína IL-8

A quantificação da proteína IL-8 foi determinada pelo Kit ELISA *Canine CXCL/IL-8 Quantikine* (R&D Systems Minneapolis, MN). Esse método consiste na utilização de um anticorpo monoclonal direcionado contra um antígeno distinto determinante sobre a molécula de IL-8. Foram utilizados os anticorpos: monoclonal *mouse anti-canine IL-8* (720 µg/mL em 1,0 mL de PBS) - captura, policlonal biotilado *mouse anti-canine IL-8* (45 µg/mL de BSA⁴/Tween-PBS⁵ – reagente diluente) - padrão e *canine recombinant IL-8* (110 ng/mL em 0,5 mL de BSA/Tween-PBS) - detecção.

No primeiro dia da reação foram acrescentados 100 µL da solução de anticorpo de captura já diluído em cada cavidade da microplaca de poliestireno e incubado com filme plástico à temperatura ambiente *overnight* (no mínimo 12 horas). No segundo dia, foram adicionados 300 µL de reagente diluente e incubado com filme plástico por uma hora. Após, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção já diluído e incubado com filme plástico por duas horas. Foram adicionados 100 µL de estreptavidina (*Streptavidina-HRP* - R&D Systems) já diluída e a foi placa coberta com papel alumínio (ausência total de luz) por 20 minutos. Foram então adicionados 100 µL de solução de substrato cromógeno ($H_2O_2 + Tetramethylbenzidine$ - R&D Systems) já diluído e a placa foi coberta com papel alumínio por 20 minutos para dar início à reação enzimática. Foram adicionados 50 µL de solução de parada (2N H_2SO_4) para cessar a reação. As amostras foram quantificadas pelo leitor de ELISA (*ThermoPlate*) com filtro de 450 nm. Ao intervalo de cada etapa - da inclusão dos anticorpos, amostras e reagentes - foi realizada a lavagem da placa, com o *chip* da lavadora programado para três lavagens com 300 µL de solução de lavagem (0,05 % Tween 20 em PBS). Todas as amostras e

padrões foram adicionados na placa em duplicata. A unidade de medida da concentração é dada em porcentagem com relação às amostras controle.

5. Análise estatística

Os dados obtidos na mensuração das proteínas foram divididas de acordo com os grupos de cadelas com neoplasia mamária e cadelas controle, bem como com as características clínico-patológicas, evolução clínica e sobrevida para o grupo de cadelas com neoplasia mamária.

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 para cada grupo foram comparadas pelo Teste T de Student. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (S.E.M.).

O valor de corte para o risco de óbito foi estabelecido por meio da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) para cada proteína analisada. 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. Utilizando o valor de corte estabelecido na curva ROC, foi calculada a curva de sobrevivência pelo método de Kaplan Meier.

Para avaliar a influência simultânea dos fatores prognósticos sobre a mortalidade foi realizada a análise de regressão logística multivariada. Valores para $p \leq 0,05$ foram

considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism4* e *Stats Direct*.

Resultados

III. RESULTADOS

1. Dados clínicos

A idade dos animais variou de 7 a 14 anos, sendo a idade média de 10 anos. Dos 25 fragmentos tumorais colhidos e histopatologicamente processados, a maioria dos tumores foi classificada como maligno (76 %), sendo predominantes os carcinomas tubulo-papilares (48 %) (Tabela 1). Dentre as características clínico-patológicas, 60 % das cadelas apresentaram tempo de evolução maior que 6 meses, 52 % dos tumores múltiplos e 40% com estadiamento clínico I. Quanto à vascularização tumoral, 32 % dos tumores apresentaram vascularização abundante e 24 % ulceração. A taxa de recidiva local foi de 20 %, metástase de 16 % e a taxa de óbito de 24 % (Tabela 2).

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

Amostra	Idade (Anos)	Tempo de Evolução (Meses)	Histopatológico	Metástase	Recidiva	Nº de nódulos	Estadiamento	Ulceração	Vascularização	Censura
1	10	mais de 6	Carcinoma em tumor misto	Não	Não	múltiplos	III	Sim	Abundante	Viva
2	13	mais de 6	Carcinoma em tumor misto	Não	Sim	único	III	Não	moderada	Viva
3	14	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Sim	Não	único	IV	Sim	abundante	Óbito
4	9	até 6	Papiloma	Não	Não	múltiplos	I	Não	moderada	Viva
5	11	até 6	Carcinoma sólido com áreas tubulares	Sim	Não	único	IV	Não	abundante	Óbito
6	10	1	Carcinoma em tumor misto	Não	Não	múltiplos	I	Não	moderada	Viva
7	10	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	múltiplos	I	Sim	abundante	Óbito
8	7	1	Adenoma complexo	Não	Não	múltiplos	I	Não	moderada	Viva
9	10	1	Tumor misto benigno	Não	Sim	múltiplos	I	Não	moderada	Viva
10	8	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Sim	múltiplos	IV	Não	abundante	Óbito
11	11	mais de 6	Sarcoma mamário	Não	Não	Único	III	Não	moderada	Viva
12	9	até 6	Carcinossarcoma	Sim	Sim	único	III	Não	moderada	Óbito
13	8	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	único	II	Sim	moderada	Viva
14	12	mais de 6	Carcinoma em tumor misto	Não	Não	único	III	Não	moderada	Viva
15	10	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	único	I	Sim	moderada	Viva
16	7	1	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	múltiplos	I	Não	moderada	Viva
17	9	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	único	I	Não	moderada	Viva
18	7	1	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	único	I	Não	moderada	Viva
19	9	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	múltiplos	III	Não	moderada	Viva
20	11	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Sim	múltiplos	II	Não	abundante	Viva
21	13	mais de 6	Carcinoma túbulo-papilar	Sim	Não	múltiplos	IV	Não	moderada	Viva
22	9	até 6	Carcinoma túbulo-papilar	Não	Não	múltiplos	III	Não	abundante	Viva
23	12	mais de 6	Carcinoma in situ	Não	Não	múltiplos	III	Não	abundante	Óbito
24	8	mais de 6	Tumor misto benigno	Não	Não	único	I	Não	moderada	Viva
25	11	mais de 6	Displasia de alto grau	Não	Não	único	III	Sim	moderada	Viva

Tabela 2: Associação entre a expressão proteínica de HIF-1 α , VEGF e IL-8 e os parâmetros clínico-patológicos das cadelas do grupo de estudo.

Parâmetros Clínico-Patológicos	Nº de pacientes	HIF-1α (%)	VEGF (pg/mL)	IL-8 (%)
Idade				
> 10 anos	10 (40 %)	103,3 \pm 9,54	737,0 \pm 194,50	528,3 \pm 71,96
\leq 10 anos	15 (60 %)	73,6 \pm 5,67	314,1 \pm 70,02	303,0 \pm 64,29
p		0,009*	0,026*	0,031*
Tempo de evolução				
> 6 meses	15 (60 %)	86,7 \pm 7,22	333,2 \pm 94,68	479,8 \pm 60,62
\leq 6 meses	10 (40 %)	83,6 \pm 10,13	502,2 \pm 98,97	263,1 \pm 80,63
p		0,799	0,257	0,039*
Nº de nódulos				
Único	12 (48%)	83,9 \pm 7,16	419,2 \pm 102,20	456,2 \pm 73,51
Múltiplos	13 (52 %)	87,5 \pm 9,91	558,0 \pm 178,20	312,8 \pm 69,32
p		0,762	0,483	0,178
Estadiamento				
I e II	13 (52 %)	85,4 \pm 9,20	319,0 \pm 88,11	349,5 \pm 76,57
III e IV	12 (48 %)	85,6 \pm 7,61	718,4 \pm 154,5	433,4 \pm 72,53
p		0,985	0,032*	0,434
Vascularização				
Moderada	17 (68 %)	84,7 \pm 8,51	400,3 \pm 98,81	370,7 \pm 73,90
Abundante	8 (32 %)	86,5 \pm 7,99	566,0 \pm 169,20	421,7 \pm 75,60
p		0,985	0,397	0,638
Ulceração				
Não	19 (76 %)	80,37 \pm 5,87	481,6 \pm 111,80	382,6 \pm 61,95
Sim	6 (24 %)	96,39 \pm 16,03	612,3 \pm 183,30	426,4 \pm 102,80
p		0,251	0,582	0,728
Metástase				
Não	21 (84 %)	81,2 \pm 5,45	421,9 \pm 76,28	406,3 \pm 56,04
Sim	4 (16 %)	116,7 \pm 23,15	1097,0 \pm 444,90	496,5 \pm 74,62
p		0,045*	0,013*	0,569
Recidiva				
Não	20 (80 %)	96,4 \pm 8,70	409,6 \pm 83,43	399,5 \pm 58,51
Sim	5 (20 %)	80,4 \pm 7,32	639,5 \pm 252,10	379,6 \pm 112,20
p		0,203	0,276	0,863
Óbito				
Não	19 (76 %)	77,6 \pm 5,60	396,3 \pm 81,79	332,0 \pm 60,03
Sim	6 (24 %)	110,6 \pm 12,35	832,3 \pm 251,90	586,8 \pm 60,49
p		0,012*	0,040*	0,034*

* valor de p significativo para o teste t de *student*

2. HIF-1 α

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária e cadelas controle ($p = 0,35$; Figura 4).

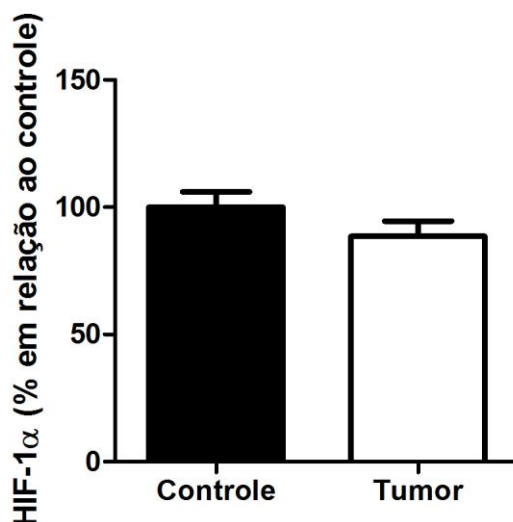


Figura 4. Representação da associação entre os níveis de HIF-1 α em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle ($p = 0,35$).

Dentre as características clínico-patológicas das cadelas com neoplasia mamária, a análise univariada mostrou que as concentrações de HIF-1 α foram significativamente maiores em tumores de cadelas com idade superior a 10 anos ($p = 0,009$; Figura 5). Além disso, concentrações de HIF-1 α foram significativamente elevadas nos tumores de cadelas que desenvolveram metástase durante o seguimento em comparação com àquelas que não desenvolveram ($p = 0,04$; Figura 6).

Com relação a evolução clínica, houve associação entre o aumento dos níveis de HIF-1 α em tumores de cadelas que vieram a óbito durante o seguimento ($p = 0,01$; Figura 7).

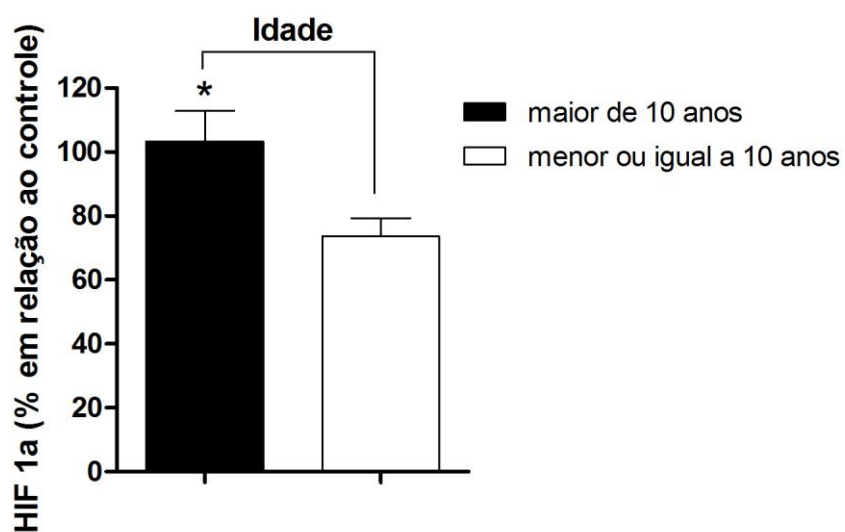


Figura 5. Representação da associação entre a concentração de HIF-1 α nos tumores mamários de cadelas e idade ($p = 0,009$). * $p =$ valor significativo pelo teste t student.

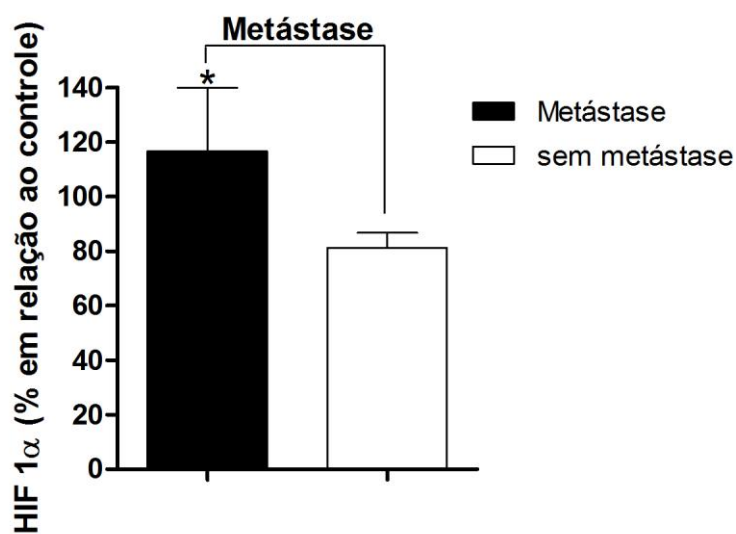


Figura 6. Representação da associação entre a concentração de HIF-1 α nos tumores mamários de cadelas e presença de metástase ($p = 0,04$). * $p =$ valor significativo pelo teste t student.

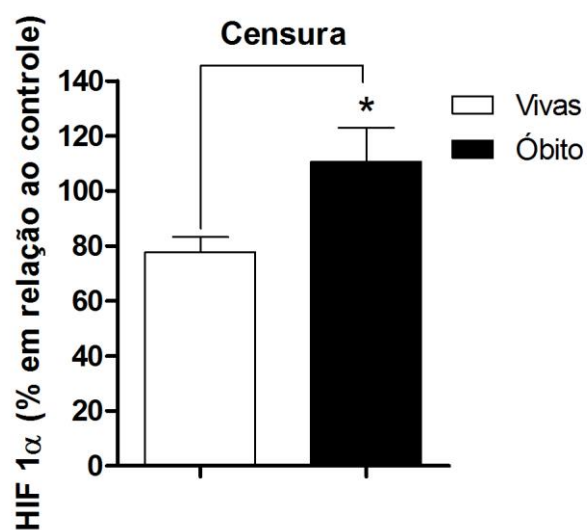


Figura 7. Representação da associação entre a concentração de HIF-1 α nos tumores mamários de cadelas e censura ($p = 0,01$). * $p =$ valor significativo pelo teste t student.

Para estabelecer o melhor valor de corte referente aos níveis de HIF-1 α foi construída uma curva ROC, a qual representa graficamente a sobreposição entre a distribuição da sensibilidade e especificidade para cada valor limite de determinado preditor. Assim, comparou-se os níveis de HIF-1 α entre as pacientes que vieram a óbito e pacientes que continuaram vivas até o final do seguimento, estabelecendo-se um valor de corte (78,33 %) como preditor de morte em cadelas com neoplasia mamária (Figura 8).

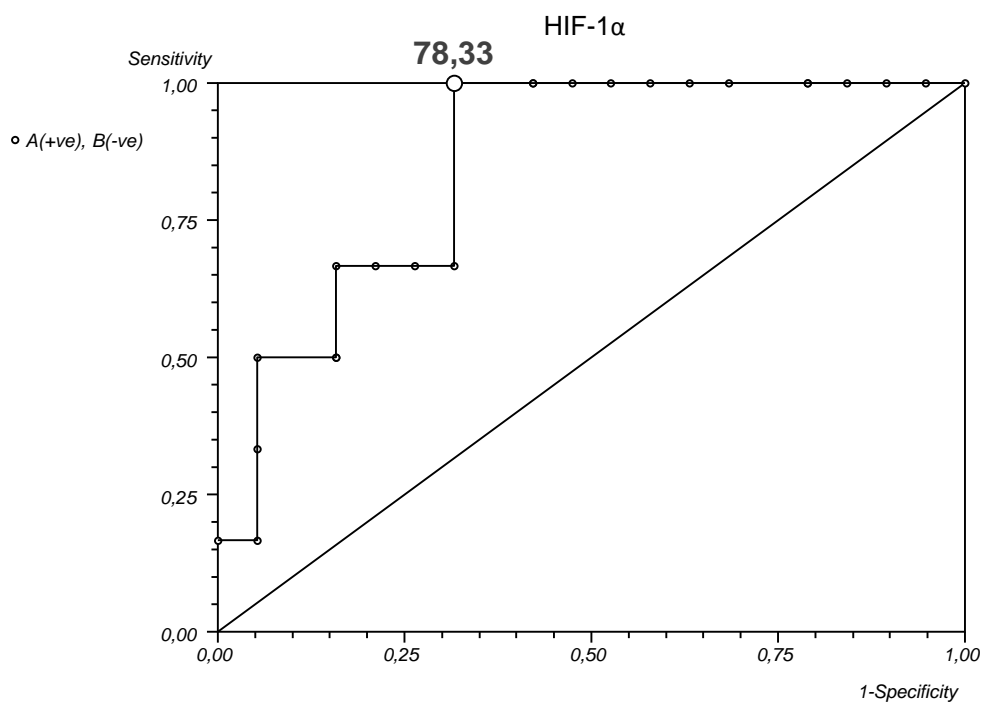


Figura 8: Valor de corte dos níveis de HIF-1 α , estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC. Sensibilidade (95%IC) = 100 %, Especificidade (95%IC) = 68 %.

Dessa forma, as cadelas foram classificadas de acordo com a alta ou baixa concentração de HIF-1 α a partir do valor de corte estabelecido pela curva ROC, para realização da curva de sobrevida. Os resultados mostraram que houve correlação estatisticamente significativa entre altos níveis de HIF-1 α e menor tempo de sobrevida global das cadelas com neoplasia mamária ($p = 0,003$) (Figura 9).

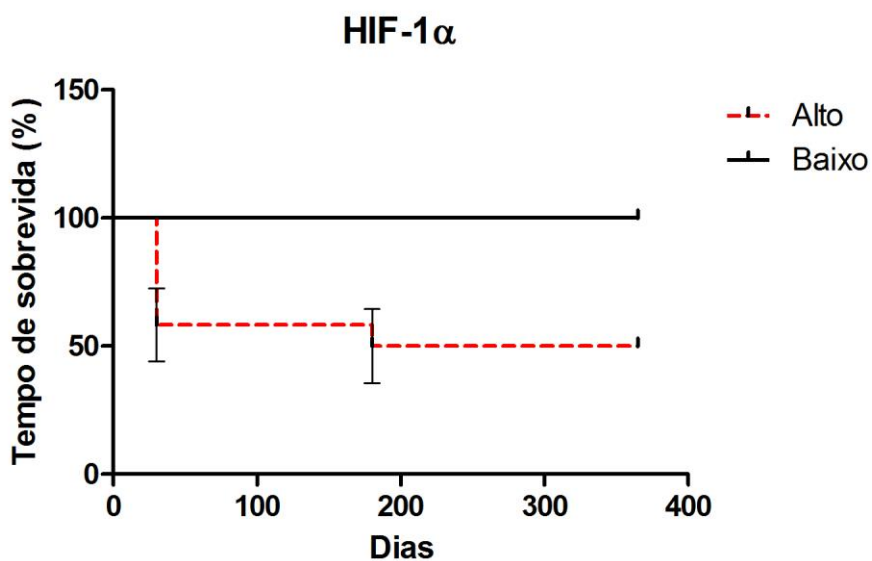


Figura 9. Sobrevivência global das cadelas com altos e baixos níveis de HIF-1 α (valor de corte: 78,33 %) ($p = 0,003$).

3. VEGF

Para os níveis proteicos de VEGF, as cadelas com neoplasia mamária apresentaram níveis elevados de VEGF em relação ao grupo controle, no entanto, o nível de significância estatística não foi alcançado ($p = 0,07$; Figura 10).

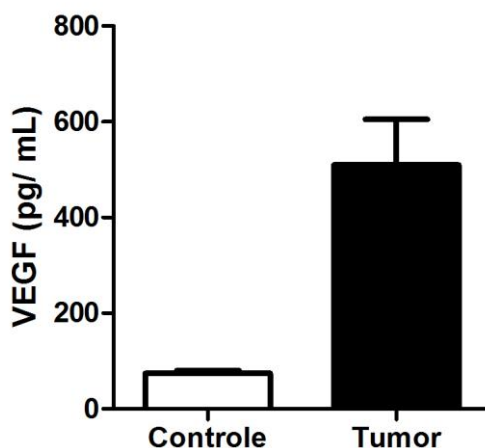


Figura 10. Representação da associação entre os níveis de VEGF em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle ($p = 0,07$).

Na análise univariada das características clínico-patológicas do grupo teste, de acordo com os níveis de HIF-1 α , as concentrações de VEGF foram significativamente maiores em tumores de cadelas com idade superior a dez anos, comparado àquelas com idade igual ou menor que dez anos ($p = 0,02$; Figura 11). Além disso, tumores com estadiamento clínico III e IV apresentam concentrações significativamente mais elevadas em comparação aos tumores com estadiamento clínico I e II ($p = 0,03$; Figura 12).

Quanto à evolução clínica, também foi observada uma associação entre o aumento dos níveis de VEGF em tumores de cadelas que vieram a óbito durante o seguimento ($p = 0,04$; Figura 13).

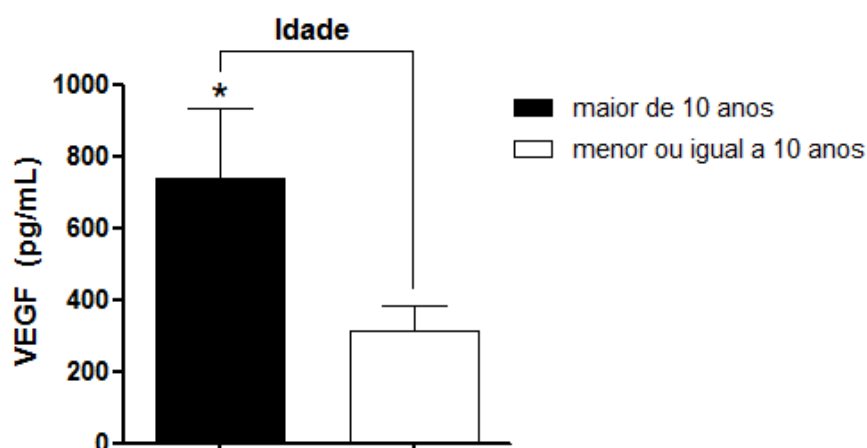


Figura 11. Representação da associação entre a concentração de VEGF nos tumores mamários de cadelas e idade ($p = 0,02$). * $p =$ valor significativo pelo teste t student.

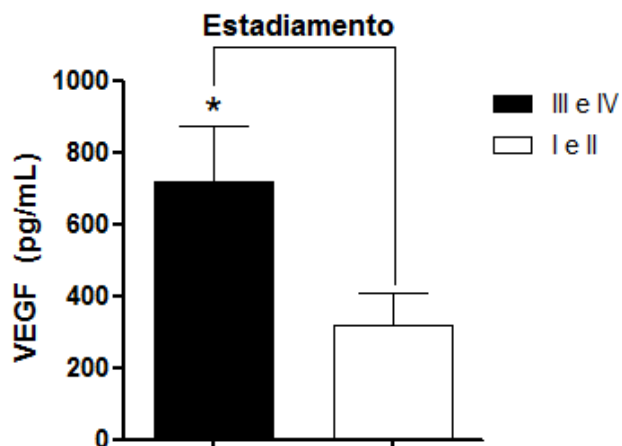


Figura 12. Representação da associação entre a concentração de VEGF nos tumores mamários de cadelas e estadiamento clínico ($p = 0,03$). * $p =$ valor significativo pelo teste t student.

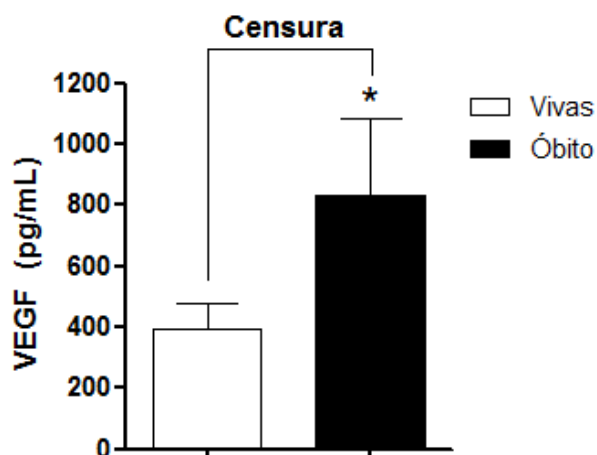


Figura 13. Representação da associação entre a concentração de VEGF nos tumores mamários de cadelas e censura ($p = 0,04$). * $p =$ valor significativo pelo teste t student.

O valor de corte estabelecido para VEGF foi de 488,86 pg/mL, com sensibilidade de 83 % e especificidade de 64 % (Figura 14).

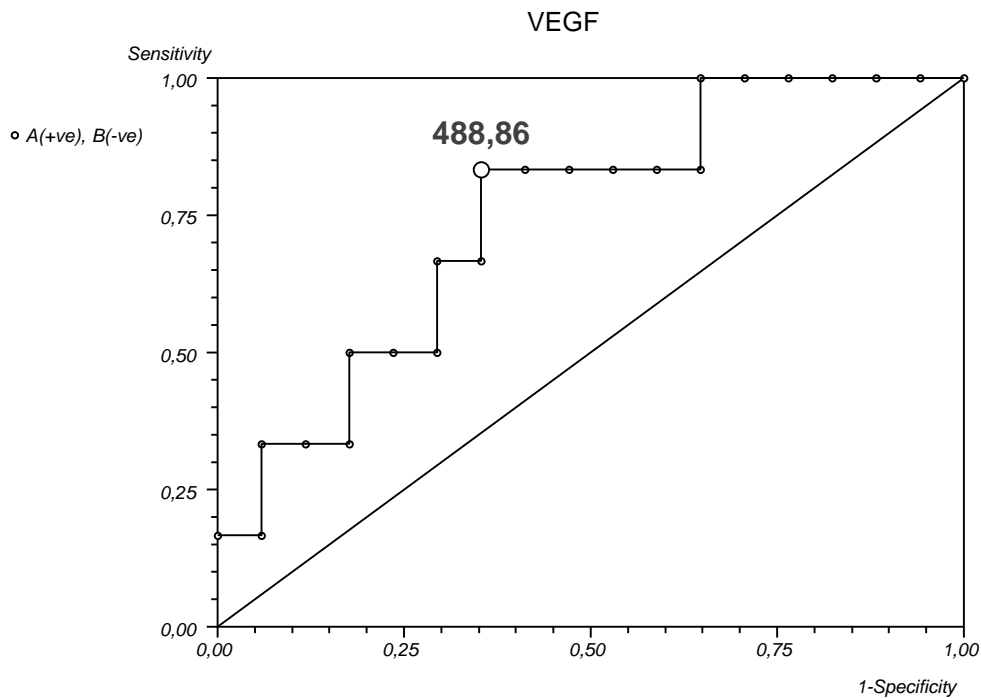


Figura 14. Valor de corte dos níveis de VEGF, estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC. Sensibilidade (95%IC) = 83 %, Especificidade (95%IC) = 64 %.

Para avaliar a relação entre os níveis de VEGF e a sobrevida das cadelas foi realizado o teste Kaplan Meier. Essa análise demonstrou associação entre a alta concentração da proteína e a menor tempo de sobrevida das cadelas com neoplasia mamária ($p < 0,04$; Figura 15).

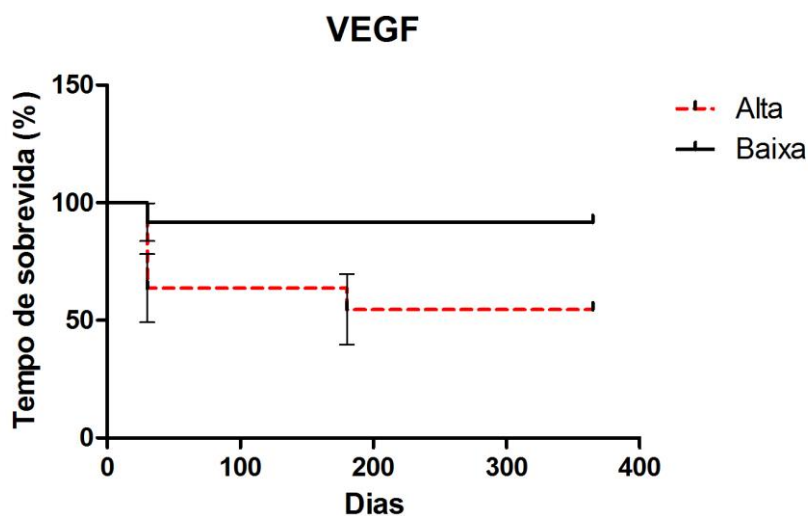


Figura 15. Sobrevida global das cadelas com altos e baixos níveis de VEGF (valor de corte: 488,83 pg/ mL) ($p = 0,04$).

4. IL-8

As cadelas com neoplasia mamária apresentaram maiores concentrações de IL-8 em relação ao grupo controle, no entanto, o nível de significância não foi alcançado ($p = 0,07$; Figura 16).

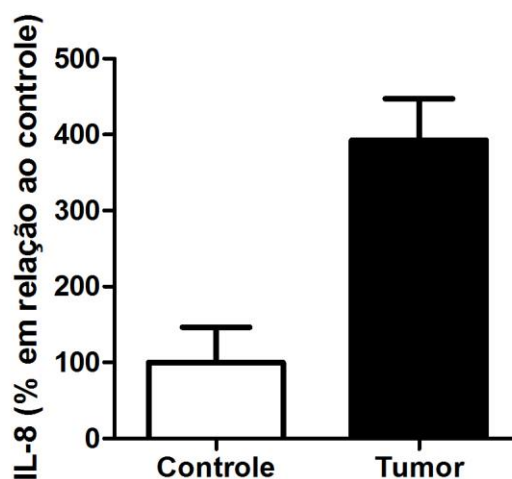


Figura 16. Representação da associação entre os níveis de IL-8 em cadelas com neoplasia mamária e o grupo controle ($p = 0,07$).

Em concordância com as outras proteínas analisadas, a análise univariada demonstrou que concentrações de IL-8 foram significativamente maiores em tumores de cadelas com idade superior a dez anos, comparado às aquelas com idade igual ou menor que dez anos ($p = 0,03$; Figura 17). Além disso, tumores que apresentaram tempo de evolução tumoral maior que seis meses ($p = 0,03$; Figura 18) também apresentaram concentrações de IL-8 significativamente mais elevadas.

Quanto à evolução clínica, houve associação entre o aumento dos níveis de IL-8 em tumores de cadelas que vieram a óbito durante o seguimento ($p = 0,03$; Figura 19).

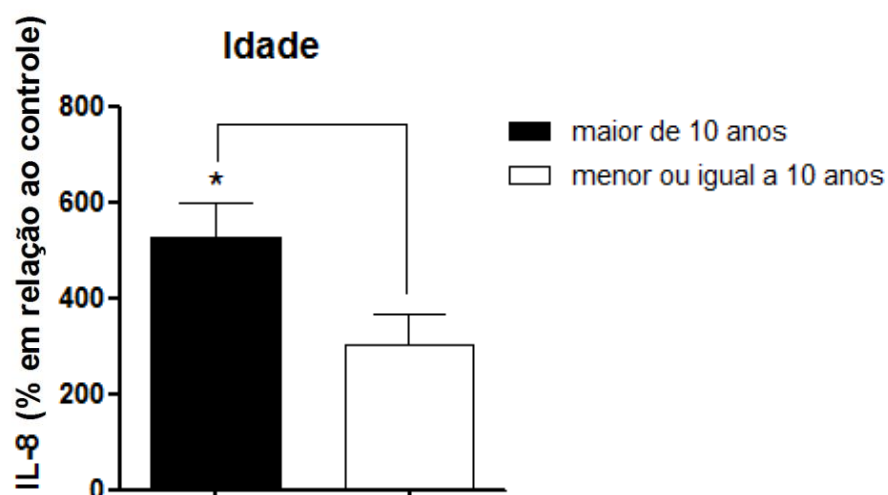


Figura 17. Representação da associação entre a concentração de IL-8 nos tumores mamários de cadelas e idade ($p=0,03$). * p = valor significativo pelo teste t student.

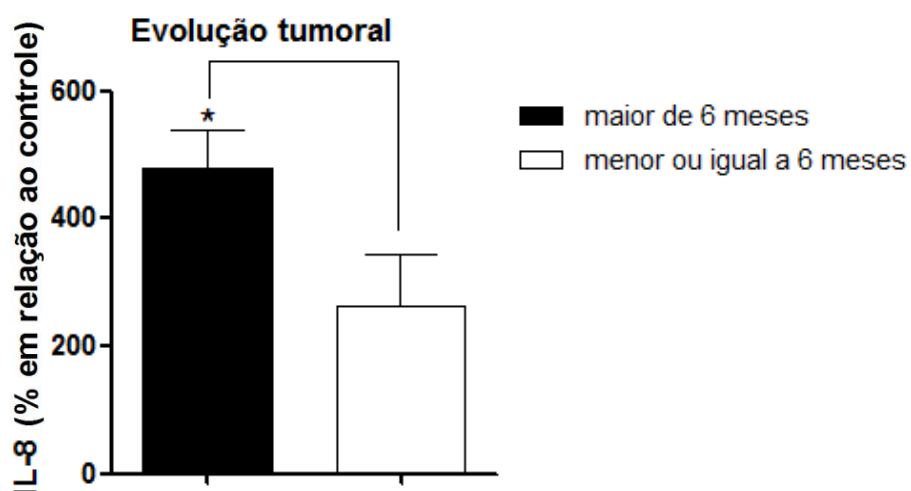


Figura 18. Representação da associação entre a concentração de IL-8 nos tumores mamários de cadelas e diferentes períodos de evolução tumoral ($p=0,03$). * $p=$ valor significativo pelo teste t student.

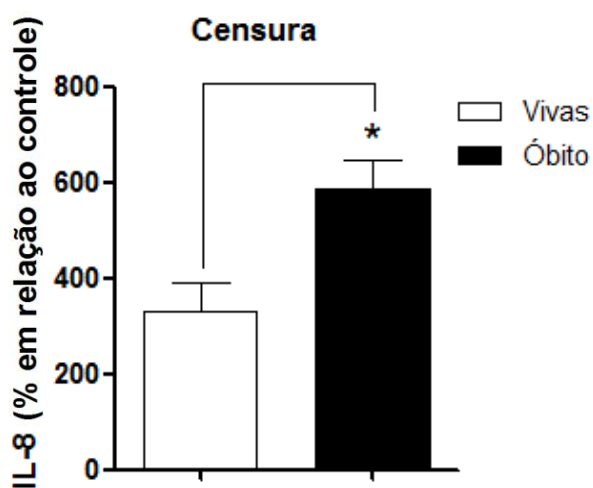


Figura 19. Representação da associação entre a concentração de IL-8 nos tumores mamários de cadelas e censura ($p=0,03$). * $p=$ valor significativo pelo teste t student.

De acordo com a análise da curva ROC, o valor de corte para prever o risco de óbito em cadelas com neoplasia mamária foi de 398,69 % (Figura 20).

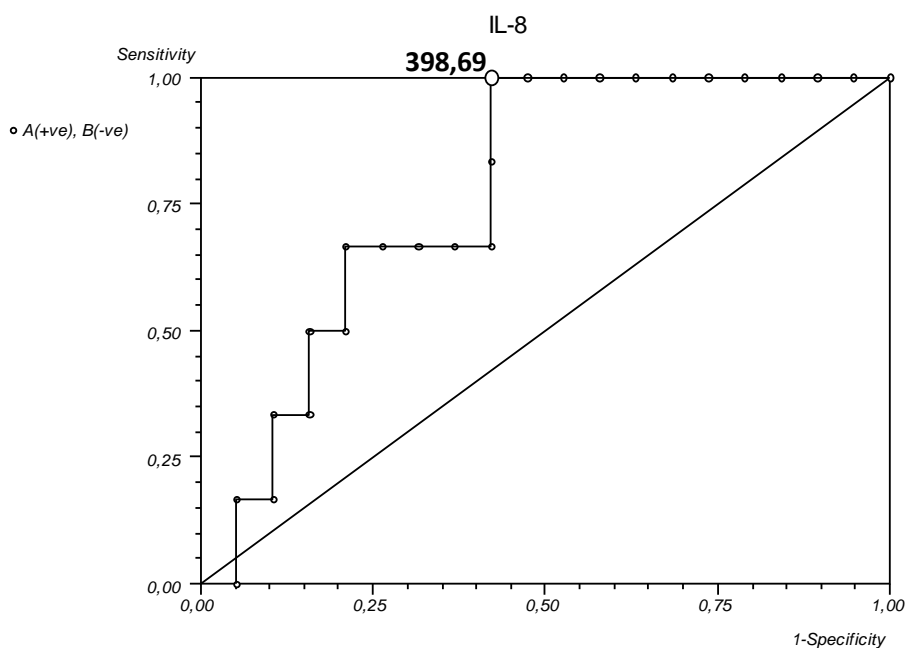


Figura 20. Valor de corte dos níveis de IL-8, estabelecido para ocorrência de óbito pela curva ROC. Sensibilidade (95%IC) = 100 %, Especificidade (95%IC) = 58 %.

O teste Kaplan Meier demonstrou que níveis elevados de IL-8 foram associados com menor sobrevida em cadelas com neoplasia mamária ($p < 0,04$; Figura 21).

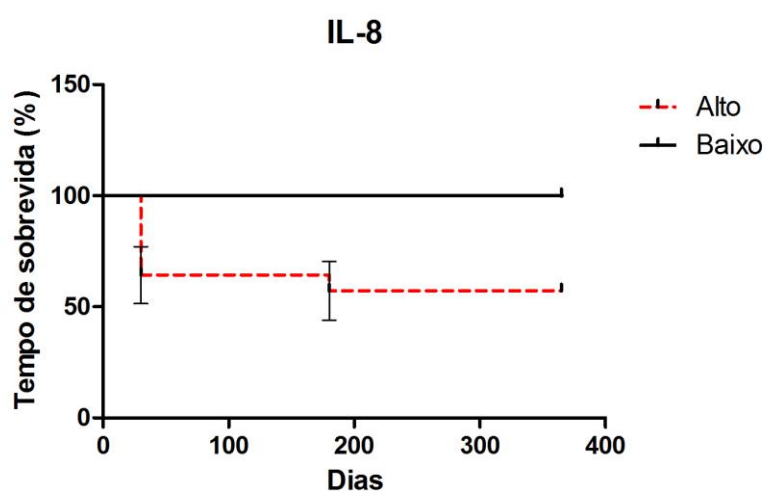


Figura 21. Sobrevida global das cadelas com altos e baixos níveis de IL-8 (valor de corte: 398,69 %) ($p = 0,01$).

A regressão logística multivariada foi realizada para verificar a influência simultânea das diferentes características clínico-patológicas e da concentração das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8, sobre o risco de óbito em cadelas com neoplasia mamária. Quando todas as características foram comparadas conjuntamente, nenhum fator foi associado com risco de óbito ($p > 0,05$). Além disso, quando os fatores prognósticos, como metástase, recidiva e estadiamento clínico III e VI foram comparados conjuntamente com a concentração das três proteínas avaliadas, também não houve associação estatística ($p > 0,05$).

A concentração de cada proteína foi individualmente comparada com esses fatores prognósticos e apenas a alta concentração de VEGF apresentou $p = 0,06$ (Tabela 3, 4 e 5).

Tabela 3. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação da concentração de HIF-1 α e alguns fatores prognóstico com risco de óbito.

Variáveis	OR	IC 95%	p
Metástase	2309,42	1,06E-16 – 5,05E+22	0,73
Recidiva	0,88	0,04 – 18,09	0,93
Estadiamento clínico	2,03	0,11 – 37,88	0,63
Altos níveis de HIF-1 α	947961,65	5,59E-23 – 1,60E+34	0,67

OR= odds ratio. IC= intervalo de confiança.

Tabela 4. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação da concentração de VEGF e alguns fatores prognóstico com risco de óbito.

Variáveis	OR	IC 95%	p
Metástase	4,58	0,13 – 153,22	0,39
Recidiva	1,54	0,06 – 35,02	0,78
Estadiamento clínico	10,04	0,36 – 279,10	0,17
Altos níveis de VEGF	18,36	0,82 – 409,00	0,06

OR= odds ratio. IC= intervalo de confiança.

Tabela 5. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação da concentração de IL-8 e alguns fatores prognóstico com risco de óbito.

Variáveis	OR	IC 95%	p
Metástase	5,79	0,25 - 129,45	0,26
Recidiva	3,06	0,12 - 78,12	0,49
Estadiamento clínico	1,66	0,06 - 40,98	0,75
Altos níveis de IL-8	1657,90	5,68E-14 - 4,83E+19	0,70

OR= odds ratio. IC= intervalo de confiança.

Além disso, quando apenas as três proteínas foram comparadas com risco de óbito, independente dos outros fatores clínico-patológicos, não houve associação estatisticamente significativa ($p > 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da análise da regressão logística multivariada nas cadelas com neoplasia mamária. Associação das concentrações de HIF-1 α , VEGF e IL-8 com risco de óbito.

Variáveis	OR	IC 95%	p
Altos níveis de HIF-1 α	20062,80	1,16E-28 - 3,46E+36	0,793
Altos níveis de VEGF	17307,16	7,85E-29 - 3,81E+36	0,797
Altos níveis de IL-8	4,99	0,150271 - 166,36	0,368

OR= odds ratio. IC= intervalo de confiança.

Discussão

IV. DISCUSSÃO

Nesse estudo, as concentrações das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 foram avaliadas no macerado tumoral como potenciais marcadores de prognóstico em cadelas com neoplasia mamária. Atualmente, sabe-se que os critérios clínico-patológicos clássicos, como classificação histológica e estadiamento clínico, muitas vezes não conseguem prever de forma acurada o prognóstico das pacientes. Tem sido demonstrado que os maiores fatores preditivos para metástase, como comprometimento de linfonodo ou grau histológico do tumor, falharam em classificar os tumores mamários de acordo com seu comportamento clínico. ⁽²³⁾

Dessa forma, atualmente a utilização de marcadores biológicos permite uma melhor avaliação do diagnóstico e prognóstico, além de auxiliar no direcionamento do tratamento individual dos tumores. ^(10, 15 – 17, 79) Ainda, vale ressaltar que a avaliação de biomarcadores no macerado tumoral representa um importante recurso na rotina clínica, uma vez que permite a avaliação do prognóstico independente da coleta de material especificamente para esse fim.

Neste estudo, os resultados mostraram que houve uma correlação entre idade avançada (superior a 10 anos) com altas concentrações de HIF-1 α , VEGF e IL-8. Além disso, altas concentrações das três proteínas avaliadas foram relacionadas com características de pior prognóstico, óbito e menor tempo de sobrevida global das pacientes.

Sabe-se que a angiogênese desempenha um importante papel no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases ⁽⁸⁰⁾ representando um fator preditivo do tempo livre da doença e da taxa de sobrevida global de pacientes com câncer. ⁽⁷⁹⁾ Diversos

fatores estão envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos no tumor, sendo o HIF-1 α e VEGF os principais fatores pró-angiogênicos desencadeadores desse processo. ⁽⁵¹⁾

Nesse estudo, altas concentrações de HIF-1 α no tumor relacionaram-se com o desenvolvimento de metástase, ocorrência de óbito e menor tempo de sobrevivência nas cadelas com neoplasia mamária. Na oncologia veterinária, a expressão do HIF-1 α e a sua relação com o comportamento biológico dos tumores é ainda pouco estudada, no entanto, tem sido correlacionada com pior prognóstico em neoplasias humanas. ^(81,82)

Estudos demonstram o aumento da expressão de HIF-1 α em sítios metastáticos de câncer de mama em relação aos tumores primários, ⁽⁸¹⁾ evidenciando a participação desse fator na progressão tumoral. Além disso, o aumento da expressão de HIF-1 α pode caracterizar a baixa resposta à terapia adjuvante com tamoxifeno desfavorecendo o prognóstico de pacientes com câncer de mama. ⁽⁸³⁾

Wang et al. ⁽⁸²⁾ realizaram uma revisão de literatura para avaliar o valor prognóstico do HIF-1 α no câncer de mama humano, englobando um total de 2933 pacientes avaliados. A alta expressão de HIF-1 α , avaliada por imuno-histoquímica, foi relacionada com a diminuição da sobrevivência global, da sobrevivência livre da doença e da sobrevivência livre de metástase à distância e recidiva. Dessa forma, os autores concluíram que altas concentrações de HIF-1 α representam um importante fator prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Sabe-se que em condições de hipóxia, o HIF-1 α não é degradado e atua como fator de transcrição para diversos genes, como aqueles envolvidos nos processos de angiogênese, metabolismo energético e desenvolvimento de metástase. ⁽⁸⁴⁾ Nesse sentido, Adams et al. ⁽⁸⁵⁾ também realizaram uma revisão de literatura para avaliar a expressão imuno-histoquímica de proteínas alvo do HIF-1 α em tumores mamários humanos. O

estudo incluiu os marcadores anidrase carbônica IX, transportador de glicose GLUT-1, receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4) e receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1R), totalizando 30.216 análises imuno-histoquímicas.

Apesar dos resultados demonstrarem relação entre a alta expressão de alguns desses marcadores com características malignas, como alto grau histológico e capacidade invasiva, houve grande variabilidade entre os estudos. ⁽⁸⁵⁾ Dessa forma, pode-se inferir que a expressão do HIF-1 α , e não de seus genes alvo, apresenta maior valor prognóstico em pacientes com câncer de mama. Além disso, na medicina veterinária, a expressão do transportador GLUT-1 foi avaliada em osteossarcoma canino e não apresentou correlação estatística com o tempo de sobrevida global e tempo livre da doença. ⁽⁸⁶⁾

Ao contrário dos nossos resultados, recentemente Moschetta ⁽⁸⁷⁾ demonstrou que houve relação entre altas concentrações de HIF-1 α com melhor prognóstico de cadelas com neoplasia mamária. É importante ressaltar que esse autor avaliou as concentrações séricas de HIF-1 α , e dado seu papel pró-angiogênico, sugere-se que a avaliação desse fator no tecido tumoral reflete com maior acurácia seu potencial valor prognóstico, conforme demonstrado nesse estudo.

Nesse estudo, tumores mamários com estadiamento clínico III e IV apresentaram concentrações de VEGF mais elevadas que tumores com estadiamento clínico I e II. Além disso, a alta concentração de VEGF no tumor relacionou-se com óbito e menor tempo de sobrevida global. Tem-se estabelecido na literatura que o risco de recidiva e óbito em pacientes com câncer de mama é relativamente proporcional ao tamanho tumoral, estadiamento clínico III e IV e presença de metástases. ⁽⁷⁹⁾

Diversos estudos têm demonstrado que altas concentrações de VEGF no tecido tumoral indicam um prognóstico ruim, no entanto, existem muitos resultados

controversos na literatura. A expressão de VEGF é frequentemente elevada em tumores malignos em comparação com tumores benignos ou com o tecido mamário normal. ⁽⁸⁸⁾ Da mesma forma, nossos resultados mostraram que houve maior concentração de VEGF em cadelas com neoplasia mamária em relação às cadelas controle.

Além disso, de acordo com nossos resultados, Qiu et al. ⁽⁸⁸⁾ demonstraram que a alta expressão de VEGF relaciona-se com estadiamento clínico e metástase no linfonodo em cadelas com neoplasia mamária. Ainda, Millanta et al. ⁽⁸⁹⁾ demonstraram aumento da expressão do VEGF em tumores com comportamento mais agressivo. Da mesma forma, mais recentemente Santos et al. ⁽⁹⁰⁾ demonstraram que a alta expressão de VEGF relaciona-se com alto grau histológico de tumores mamários de cadelas.

No entanto, ao contrário desses estudos, outro estudo de Millanta et al. ⁽⁶³⁾ demonstrou que a expressão de VEGF em cadelas com neoplasia mamária não apresentou correlação estatística com os parâmetros clínico-patológicos avaliados ou com o prognóstico.

Além da avaliação dos níveis de VEGF no tumor, a avaliação dos níveis séricos desse fator também parece ter importante valor prognóstico. Um estudo de Kato et al. ⁽⁹¹⁾ demonstrou aumento dos níveis séricos de VEGF em cadelas com neoplasia mamária maligna quando 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. ⁽⁹²⁾ altos níveis de VEGF foram verificados em pacientes com câncer de mama de maior estadiamento clínico e com metástase em linfonodos axilares, evidenciando seu papel no aumento da vascularização tumoral e conseqüente desenvolvimento de metástases. Ainda, Jia et al. ⁽⁹³⁾ e Kapahi et al. ⁽⁹⁴⁾ encontraram

elevadas concentrações de VEGF no soro de pacientes com câncer de mama, o que foi relacionado com baixa taxa de sobrevida.

Da mesma forma, estudos de Coskun et al. ⁽⁹⁵⁾ Perez-Rivas et al. ⁽⁹⁶⁾ e Berezov et al. ⁽⁹⁷⁾ verificaram altos níveis de VEGF em pacientes com tumores de mama altamente invasivos e metastáticos. Esses estudos consideraram o VEGF um fator prognóstico que pode ser incorporado a prática clínica, e utilizado em conjunto com os parâmetros clínico-patológicos, para auxiliar na avaliação da recidiva tumoral e sobrevida de pacientes com câncer de mama.

No entanto, estudos controversos também são encontrados com relação ao valor prognóstico da concentração sérica de VEGF. Duranyildiz et al. ⁽⁹⁸⁾ e El Tarhouny et al. ⁽⁹⁹⁾ não encontraram diferença significativa nos níveis séricos de VEGF entre os grupos com câncer de mama e controle. Além disso, Hodorowicz-Zaniewska et al. ⁽¹⁰⁰⁾ não encontraram associação entre os níveis de VEGF e os parâmetros clínico-patológicos estudados, e Bachelot et al. ⁽¹⁰¹⁾ não encontraram relação do VEGF com a taxa de sobrevida das pacientes, e portanto não consideram o VEGF um potencial marcador prognóstico no câncer de mama.

Sabe-se que além da angiogênese, há uma forte correlação entre a inflamação no microambiente tumoral com a gênese e progressão do câncer. Dessa forma, além dos fatores pró-angiogênicos avaliados nesse estudo, a IL-8, uma citocina pró-inflamatória e pró-angiogênica, pode representar um potencial marcador prognóstico. O aumento na expressão de IL-8 tem sido observado em células tumorais, endoteliais, neutrófilos infiltrantes e macrófagos associados ao tumor, sugerindo seu papel regulatório no microambiente tumoral ⁽¹⁴⁾. Nossos resultados mostraram que houve correlação entre

altas concentrações de IL-8 com evolução tumoral maior que seis meses, ocorrência de óbito e menor tempo de sobrevida global nas cadelas com neoplasia mamária.

De acordo com esses resultados, diversos estudos têm relacionado fatores inflamatórios e angiogênicos à malignidade tumoral e indicam que a expressão da IL-8 pode ser utilizada para prever o prognóstico de pacientes com câncer. Perez et al.⁽¹⁰²⁾ e Yeon et al.⁽¹⁰³⁾ demonstraram que pacientes com câncer de mama apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Da mesma forma, nossos resultados mostram que cadelas com neoplasia mamária apresentam níveis elevados de IL-8 em comparação com cadelas controle. Além disso, de acordo com nossos resultados, Benoy et al.⁽¹⁰⁴⁾ e Kozlowski et al.⁽¹⁰⁵⁾ encontraram elevadas concentrações de IL-8 em pacientes com câncer de mama em estágio avançado, os quais apresentaram menor tempo de sobrevida.

Em concordância, estudos de Ahmed et al.⁽¹⁰⁶⁾ e Yao et al.⁽¹⁰⁷⁾ verificaram altos níveis de IL-8 em pacientes com câncer de mama e encontraram relação com envolvimento linfonodal, tipo histológico e presença de metástase. Além disso, apesar de não encontrar diferença nos níveis de IL-8 em pacientes com câncer e controle, Derin et al.⁽⁹⁾ demonstraram que altos níveis dessa proteína relaciona-se com presença de metástase nas pacientes com câncer de mama. Bobrovnikova-Marjon et al.⁽⁷⁵⁾ e De Larco et al.⁽¹⁰⁸⁾ também relacionaram a IL-8 ao fenótipo metastático de tumores mamários. Mais recentemente, Razmkhah et al.⁽¹⁰⁹⁾ encontraram alta expressão de IL-8 e de outras citocinas e seus receptores em pacientes com câncer de mama com metástase em linfonodo em comparação com aquelas sem metástase. Ainda, Kamalakar et al.⁽¹¹⁰⁾ demonstraram que os níveis de IL-8 são elevados em pacientes com câncer de mama e metástase óssea, sugerindo a utilização de terapias anti-IL-8 para prevenção de metástase óssea em pacientes com câncer de mama.

Milovanovic et al. ⁽¹¹¹⁾ avaliaram os níveis de IL-8 em macerado tumoral de mulheres com câncer de mama e demonstraram que altas concentrações dessa proteína relaciona-se com pior prognóstico. A expressão de IL-8 foi também relacionada com tumores receptor de estrógeno negativo. Da mesma forma, Cho et al. ⁽¹¹²⁾ demonstraram que altos níveis de IL-8 foram associados com menor tempo de sobrevida livre de recidiva em pacientes com câncer de mama HER-2/neu negativo, indicando associação dessa citocina com subtipos específicos de câncer de mama.

A alta expressão de IL-8 também foi associada com pior prognóstico em outros tipos tumorais como melanoma, câncer gástrico, de ovário e próstata. ⁽⁷⁴⁾ Além disso, altos níveis de IL-8 foram encontrados no plasma de cadelas com cistite, dermatite e câncer gástrico, indicando a utilização dessa citocina no diagnóstico de doenças inflamatórias em cães. ⁽¹¹³⁾

Na oncologia veterinária, de Andrés et al., ⁽¹¹⁴⁾ demonstraram que os níveis de IL-8 foram maiores no soro e no macerado tumoral de cadelas com tumor de mama inflamatório em relação as cadelas com tumores mamários não inflamatórios. Kim et al. ⁽¹¹⁵⁾ demonstraram que a IL-8 contribui com o desenvolvimento de um microambiente tumoral permissivo durante a tumorigênese de hemangiosarcoma canino. Tumores com alta expressão de IL-8 apresentaram características de inflamação, ativação da coagulação e fibrose. Ainda, em concordância com nossos resultados, Gelaleti et al. ⁽⁷⁾ demonstraram que altos níveis de IL-8 foram encontrados no soro de cadelas com neoplasia mamária e houve uma correlação positiva entre concentrações dessa citocina e progressão tumoral, metástase no linfonodo, recidiva e óbito.

Um estudo avaliando os níveis plasmáticos de diversos fatores angiogênicos em pacientes com câncer de mama e mulheres controle, demonstrou que os níveis de IL-8 e

VEGF estavam aumentados nas pacientes com câncer e apresentaram diminuição sete dias após a retirada do tumor. ⁽¹¹⁶⁾ No entanto, nesse estudo, a análise multivariada demonstrou que não houve influência simultânea da concentração das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 sobre o risco de óbito das cadelas com neoplasia mamária.

Conclusões

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu concluir que:

Altas concentrações de HIF-1 α , VEGF e IL-8 relacionam-se com parâmetros clínico-patológicos de prognóstico ruim e pior evolução clínica, sugerindo o importante papel desses fatores na progressão da doença;

- Tumores mamários apresentam um aumento da concentração de VEGF e IL-8 em relação as amostras mamárias controle;
- Altas concentrações das três proteínas avaliadas são encontradas em cadelas com neoplasia mamária com mais de dez anos;
- Altas concentrações de HIF-1 α relaciona-se com presença de metástase, VEGF com estadiamento clínico III e IV e IL-8 com evolução maior que seis meses (Tempo do diagnóstico até o momento da cirurgia);
- Altas concentrações de HIF-1 α , VEGF e IL-8 relacionam-se com óbito e menor tempo de sobrevida global em cadelas com neoplasia mamária, destacando esses fatores como potenciais marcadores de prognóstico ruim. Dessa forma, a avaliação dos níveis de HIF-1 α , VEGF e IL-8 no tecido tumoral pode auxiliar no estabelecimento do prognóstico em pacientes com câncer de mama.

Referências

VI. REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2014.
2. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2012.
3. Zuccari DAPC, Pavam MV, Terzian ACB, 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; 207-15.
4. Andrade FH, Figueiroa FC, Bersano PR, Bissacot DZ, Rocha NS. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagn Pathol.* 2010;5:45.
5. Chu PY, Hsu NC, Liao AT, Shih NY, Hou MF, Liu CH. Overexpression of α -enolase correlates with poor survival in canine mammary carcinoma. *BMC Vet Res.* 2011;7:62.
6. Michel E, Feldmann SK, Kowalewski MP, Bley CR, Boos A, Guscetti F, et al. Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. *BMC Vet Res.* 2012;8:72.
7. Gelaleti GB, Jardim BV, Leonel C, Moschetta MG, Zuccari DA. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;146(2):106-12.
8. 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(4):220-7.
9. 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(2):163-8.
10. Hicks DG, Kulkarni S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer: the importance of accurate human epidermal growth factor receptor 2 testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(6):1008-15.
11. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol.* 2009;7(3):162-72.
12. Almeida JRC. Marcadores tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia;* 2007. p. 1247-55.
13. Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(3A):1247-55.
14. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-41.
15. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2007;608:1-22.
16. 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(2):313-25.

17. Duffy MJ, O'Donovan N, Crown J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(2):151-9.
18. Eyzaguirre E, Haque AK. Application of immunohistochemistry to infections. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(3):424-31.
19. Gama S, Mendes F, Marques F, Santos IC, Carvalho MF, Correia I, et al. Copper(II) complexes with tridentate pyrazole-based ligands: synthesis, characterization, DNA cleavage activity and cytotoxicity. *J Inorg Biochem.* 2011;105(5):637-44.
20. Leong FY, Li Q, Lim CT, Chiam KH. Modeling cell entry into a micro-channel. *Biomech Model Mechanobiol.* 2011;10(5):755-66.
21. Payne JK, Held J, Thorpe J, Shaw H. Effect of exercise on biomarkers, fatigue, sleep disturbances, and depressive symptoms in older women with breast cancer receiving hormonal therapy. *Oncol Nurs Forum.* 2008;35(4):635-42.
22. 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(3):223-34.
23. Van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *J Clin Oncol.* 2005;23(8):1631-5.
24. 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
25. Weis SM, Cheresch DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine.* 2011;17(11):1359-70.
26. Arbab AS. Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histology and histopathology.* 2012;27(5):549-57.
27. Thomas HG, Richmond A. Immunoaffinity purification of melanoma growth stimulatory activity. *Arch Biochem Biophys.* 1988;260(2):719-24.
28. Brito LG, Schiavon VF, Andrade JM, Tiezzi DG, Peria FM, Marana HR. Expression of Hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor-C in locally advanced breast cancer patients. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(8):1313-20.
29. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukarakaki 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(6):R84.
30. Gelao L, Criscitiello C, Fumagalli L, Locatelli M, Manunta S, Esposito A, et al. Tumour dormancy and clinical implications in breast cancer. *eCancer.* 2013, 7:1-15.
31. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(3):227-41.
32. Gavalas NG, Lontos M, Trachana SP, Bagratuni T, Arapinis C, Liacos C, et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. *International journal of molecular sciences.* 2013;14(8):15885-909.
33. 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 investigation.* 2010;28(6):588-97.

34. Liu AY, Ouyang G. Tumor angiogenesis: a new source of pericytes. *Current biology : CB*. 2013;23(13):R565-8.
35. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
36. Haim K, Weitzenfeld P, Meshel T, Ben-Baruch A. Epidermal growth factor and estrogen act by independent pathways to additively promote the release of the angiogenic chemokine CXCL8 by breast tumor cells. *Neoplasia*. 2011;13(3):230-43.
37. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):401-10.
38. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
39. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(1):38-47.
40. Milani M, Harris AL. Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44(18):2766-73.
41. Vordermark D. Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. *BMC medicine*. 2010;8:45.
42. Sadri N, Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers*. 2013;5(2):320-33.
43. Lu J, Zhang K, Chen S, Wen W. Grape seed extract inhibits VEGF expression via reducing HIF-1alpha protein expression. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):636-44.
44. 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-1alpha (HIF-1alpha) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2011;286(12):10773-82.
45. 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 Biochem Biophys*. 2011;509(1):1-8.
46. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*. 2009;107(6):1053-62.
47. Druyan S, Cahaner A, Ashwell CM. The expression patterns of hypoxia-inducing factor subunit alpha-1, heme oxygenase, hypoxia upregulated protein 1, and cardiac troponin T during development of the chicken heart. *Poult Sci*. 2007;86(11):2384-9.
48. 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(1):30-54.
49. Lee HL, Eom HS, Yun T, Kim HJ, Park WS, Nam BH, et al. Serum and urine levels of interleukin-8 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cytokine*. 2008;43(1):71-5.
50. 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-1alpha transcriptional activity. *EMBO J*. 2003;22(8):1857-67.
51. Tung KH, Lin CW, Kuo CC, Li LT, Kuo YH, Wu HC. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 α and VEGF signaling. *Cancer Lett*. 2013;331(1):58-67.

52. Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(3):538-48.
53. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002;8(4 Suppl):S62-7.
54. Austin BA, Liu B, Li Z, Nussenblatt RB. Biologically active fibronectin fragments stimulate release of MCP-1 and catabolic cytokines from murine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(6):2896-902.
55. Dales JP, Beaufils N, Silvy M, Picard C, Pauly V, Pradel V, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha gene (HIF-1alpha) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Med.* 2010;8:44.
56. 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.
57. Almodovar CR, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiological Reviews.* 2009; 89: 607-648.
58. 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.
59. Greenberg S, Rugo HS. Triple-negative breast cancer: role of antiangiogenic agents. *Cancer J.* 2010;16(1):33-8.
60. Delli Carpini J, Carpini JD, 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(1):43-58.
61. 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.
62. 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(3):181-4.
63. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D, et al. 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. *Res Vet Sci.* 2006;81(3):350-7.
64. Zhang T, Fang HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70(3):281-9.
65. Koukourakis MI, Limberis V, Tentes 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(3):370-5.
66. 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;9:191.
67. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA, et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clin Med Insights Oncol.* 2010;4:15-34.
68. Matsuo Y, Ding Q, Desaki R, Maemura K, Mataka Y, Shinchu H, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha plays a pivotal role in hepatic metastasis of pancreatic

- cancer: an immunohistochemical study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014;21(2):105-12.
69. 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.* 2014;116(1):148-57.
 70. Leek RD, Harris AL, Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 1994;56(4):423-35.
 71. Shahzad A, Knapp M, Lang I, Köhler G. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker? *Int Arch Med.* 2010;3:11.
 72. 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.
 73. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000;12(2):121-7.
 74. Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12(4):375-91.
 75. Bobrovnikova-Marjon EV, Marjon PL, Barbash O, Vander Jagt DL, Abcouwer SF. Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *Cancer Res.* 2004;64(14):4858-69.
 76. Kim KS, Cho G, Jung IH. Optimal treatment strategy for a tumor model under immune suppression. *Comput Math Methods Med.* 2014;2014:206287.
 77. Cassali LN, Bertagnolli AC, Tavares WLF, Ferreira E, Silva AE. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary neoplasmas in dogs. São Paulo: 34th World Small Animal Veterinary Congress; 2010.
 78. Owen LN. Classification of tumors of domestic animals. Geneva: 1st ed. WHO; 1980.
 79. Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2002;48:113-31.
 80. 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.
 81. 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.
 82. Wang W, He YF, Sun QK, Wang Y, Han XH, Peng DF et al. Hypoxia-inducible factor 1 α in breast cancer prognosis. *ClinChimActa* 2013, pii: S0009-8981(13)00427-0.
 83. 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.
 84. Snell CE, Turley H, McIntyre A, Li D, Masiero M, Schofield CJ et al. Proline-hydroxylated hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) upregulation in human tumours. *PLoS One.* 2014;9:e88955.

85. Adams A, van Brussel AS, Vermeulen JF, Mali WP, van der Wall E, van Diest PJ et al. The potential of hypoxia markers as target for breast molecular imaging--a systematic review and meta-analysis of human marker expression. *BMC Cancer*. 2013;13:538.
86. Petty JC, Lana SE, Thamm DH, Charles JB, Bachand AM, Bush JM et al. Glucose transporter 1 expression in canine osteosarcoma. *Vet Comp Oncol*. 2008;6:133-40.
87. Moschetta, M.G. Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação sérica e molecular do VEGF e do HIF-1 α [dissertação]. São José do Rio Preto (SP): Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 2013.
88. 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
89. 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.
90. Santos AA, Lopes CC, Ribeiro JR, Martins LR, Santos JC, Amorim IF, et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. *BMC Vet Res*. 2013;9:1.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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]
95. 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.
96. 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.
97. 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
98. Duranyildiz D, Camlica H, Soydinc HO, Derin D, Yasasever V. Serum levels of angiogenic factors in early breast cancer remain close to normal. *Breast*. 2009;18:26-29.

99. El Tarhouny, 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.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. Yeon JY, Suh YJ, Kim SW, Baik HW, Sung CJ, Kim HS et al. Evaluation of dietary factors in relation to the biomarkers of oxidative stress and inflammation in breast cancer risk. *Nutrition*. 2011;27:912-8.
104. Benoy IH, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpé S et al. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7157-62.
105. Kozłowski L, Zakrzewska I, Tokajuk P, Wojtukiewicz MZ. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. *Rocz Akad Med Białymst.* 2003;48:82-4.
106. Ahmed OI, Adel AM, Diab DR, Gobran NS. Prognostic value of serum level of interleukin-6 and interleukin-8 in metastatic breast cancer patients. *Egypt J Immunol*. 2006;13:61-8.
107. Yao M, Zhou RH, Petreaca M, Zheng L, Shyy J, Martins-Green M. Activation of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) is critical in IL-8-induced angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2006;80:608-20.
108. De Larco JE, Wuertz BR, Yee D, Rickert BL, Furcht LT. Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13988-93.
109. Razmkhah M, Jaberipour M, Safaei A, Talei AR, Erfani N, Ghaderi A. Chemokine and chemokine receptors: a comparative study between metastatic and nonmetastatic lymph nodes in breast cancer patients. *Eur Cytokine Netw*. 2012;23:72-7.
110. Kamalakar A, Bendre MS, Washam CL, Fowler TW, Carver A, Dilley JD et al. Circulating interleukin-8 levels explain breast cancer osteolysis in mice and humans. *Bone*. 2014;61:176-85.
111. Milovanovic J, Todorovic-Rakovic N, Abu Rabi Z. The prognostic role of interleukin-8 (IL-8) and matrix metalloproteinases -2 and -9 in lymph node-negative untreated breast cancer patients. *J BUON*. 2013;18:866-73.
112. Cho YA, Sung MK, Yeon JY, Ro J, Kim J. Prognostic role of interleukin-6, interleukin-8, and leptin levels according to breast cancer subtype. *Cancer Res Treat*. 2013;45:210-9.

113. Mohamed A, Matsumoto Y, Yoshihara K, Matsumoto Y, Watari T, Tsujimoto H et al. Establishment of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay for canine interleukin-8. *J Vet Med Sci.* 1997;59:39-41.
114. Andrés PJ, Illera JC, Cáceres S, Díez L, Pérez-Alenza MD, Peña L. Increased levels of interleukins 8 and 10 as findings of canine inflammatory mammary cancer. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013;152:245-51.
115. Kim JH, Frantz AM, Anderson KL, Graef AJ, Scott MC, Robinson S et al. Interleukin-8 promotes canine hemangiosarcoma growth by regulating the tumor microenvironment. *Exp Cell Res.* 2014;323:155-64.
116. Georgiou GK, Igglezou M, Sainis I, Vareli K, Batsis H, Briasoulis E, Fatouros M. Impact of breast cancer surgery on angiogenesis circulating biomarkers: a prospective longitudinal study. *World J Surg Oncol.* 2013;11:213.

VII. APÊNDICE

Apêndice A: Protocolos de preparo das soluções.

¹ 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

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

³ ABB	Transcription Factor Antibody Binding Buffer -----	3 mL
	H ₂ O Destilada -----	27 mL

⁴ BSA	PBS-----	12 mL
	BSA-----	0,5 g

⁵ 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

VIII. ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



Of. CEUA 19/2014

São José do Rio Preto 03 de Outubro de 2014

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEUA/FAMERP declara que o projeto intitulado: **"Valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 em macerado tumoral mamário canino"** sob a responsabilidade da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari, é parte do Protocolo FAMERP nº 001-005230/2010 intitulado: **"Avaliação de novos marcadores prognósticos e preditivos em neoplasia mamária de cadelas: Avaliação sérica e molecular do VEGF e do HIF-1"** aprovado por esta comissão na data 27 de Setembro de 2010.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Debora A. Pires de Campos Zuccari
Pesquisadora Responsável pelo Projeto

Prof. Dra. Glória Elisa Florido Mendes
1ª Secretária da CEUA

ANEXO B - 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”

→ “Valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 em macerado tumoral mamário canino”

Pesquisadores Responsáveis: Prof^ª. Dra. Debora A. P. C. Zuccari – Coordenadora / José Henrique Musumeci Ferreira– Mestrando / Marina Gobbe Moschetta - Doutoranda

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), fator induzido por hipóxia (HIF-1) e interleucina 8 (IL-8) em cadelas em diferentes momentos, 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 (fragmento 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 subsequentes 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 C - 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 ()

Ferreira, José Henrique Musumeci

Valor prognóstico das proteínas HIF-1 α , VEGF e IL-8 em macerado tumoral mamário canino / José Henrique Musumeci Ferreira

São José do Rio Preto. 2014

66p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Ciências da Saúde

Orientador: Profa. Dra. Debora A.P.C. Zuccari

1. Marcadores tumorais; 2. Angiogênese; 3. ELISA; 4. HIF-1 α ; 5. VEGF; 7. IL-8.