

NATHALIA MENDES FIGUEIREDO

**EXPRESSÃO DE MARCADORES TUMORAIS CRYAB E VEGF EM
HEMANGIOSSARCOMAS CANINOS E SUA RELAÇÃO COM O GRAU
HISTOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Fabrício Luciani Valente

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa – Campus Viçosa**

T

F475e
2023

Figueiredo, Nathalia Mendes, 1996-
Expressão dos marcadores tumorais CRYAB e VEGF em
hemangiossarcomas caninos e sua relação com o grau histológico / Nathalia
Mendes Figueiredo. - Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (35 f.): il. (algumas color.).
Orientador: Fabrício Luciani Valente
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.
Referências bibliográficas: .
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.083>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças; 2. Sarcoma; 3. Imuno-histoquímica; 4. Marcadores
biológicos de tumor; 5. Vasos sanguíneos - Crescimento; I. Valente, Fabrício
Luciani II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária III. Título

CDD 22. ed. 636.70896994

Bibliotecário(a) responsável: ALICE REGINA PINTO PIRES CRB-6/2523


NATHALIA MENDES FIGUEIREDO

**EXPRESSÃO DE MARCADORES TUMORAIS CRYAB E VEGF EM
HEMANGIOSSARCOMAS CANINOS E SUA RELAÇÃO COM O GRAU
HISTOLÓGICO**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de julho de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **NATHALIA MENDES FIGUEIREDO**
Data: 02/04/2024 22:29:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Nathalia Mendes Figueiredo
Autora

Documento assinado digitalmente
 **FABRICIO LUCIANI VALENTE**
Data: 05/04/2024 14:26:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fabício Luciani Valente
Orientador

A Deus.

Aos meus pais.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

FIGUEIREDO, Nathalia Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Expressão de marcadores tumorais CRYAB e VEGF em hemangiossarcomas caninos e sua relação com o grau histológico.** Orientador: Fabrício Luciani Valente.

Os sarcomas de tecidos moles (STM) são neoplasias malignas que surgem de diferentes tipos de tecido conjuntivo e células do endotélio vascular. Eles são classificados em STM de origem cutânea, subcutânea e visceral. Os STM são altamente heterogêneos, com mais de 50 subtipos histológicos distintos, e apresentam comportamentos biológicos variados. O manejo dos STM apresenta desafios significativos devido à alta taxa de mortalidade, formação de metástases, resistência à quimioterapia e recidivas após o tratamento. O diagnóstico específico dos STM é complexo devido à variedade de subtipos e à limitação das amostras disponíveis para biópsia. A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica avançada na patologia que permite a identificação de alterações genéticas moleculares subjacentes aos STM por meio de marcadores específicos. A expressão de duas proteínas, CRYAB e VEGF, estão associadas à progressão tumoral e formação de metástases em vários tipos de câncer. No entanto, existem poucos estudos sobre a distribuição e influência dessas moléculas em STM e na espécie canina. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das proteínas CRYAB e VEGF em hemangiossarcomas caninos e relacionar esses achados com o grau histológico dos tumores. Para isso, foram analisadas 35 amostras de hemangiossarcomas caninos. Os fragmentos tumorais foram avaliados quanto ao grau histológico de diferenciação, necrose e taxa mitótica. Além disso, foram realizados testes imuno-histoquímicos utilizando anticorpos específicos para as proteínas VEGF e CRYAB. As lâminas foram avaliadas quanto à intensidade da marcação e quantidade de células marcadas. Conclui-se que o aumento da expressão de VEGF não está relacionado a um aumento da expressão de CRYAB em hemangiossarcomas caninos e que CRYAB não está relacionada aos fatores protetores de modulação do microambiente tumoral expressos pelos hemangiossarcomas nesta espécie.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Marcadores. Sarcoma. Angiogênese

ABSTRACT

FIGUEIREDO, Nathalia Mendes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Expression of CRYAB and VEGF tumor markers in canine hemangiosarcomas and their relationship with histological grade.** Advisor: Fabrício Luciani Valente.

Soft tissue sarcomas (STS) are malignant neoplasms that arise from different types of connective tissue and vascular endothelial cells. They are classified by origin into STS cutaneous, subcutaneous, and visceral. STS are highly heterogeneous, with more than 50 distinct histological subtypes, and exhibit varied biological behaviors. The management of STS presents significant challenges due to the high mortality rate, metastasis formation, resistance to chemotherapy and relapses after treatment. The specific diagnosis of STS is complex due to the variety of subtypes and the limited number of samples available for biopsy. Immunohistochemistry (IHC) is an advanced technique in pathology that allows the identification of molecular genetic alterations underlying STS by means of specific markers. The expression of two proteins, CRYAB and VEGF, are associated with tumor progression and metastasis formation in several types of cancer. However, there are few studies on the distribution and influence of these molecules in STS and in dogs. The objective of this work was to evaluate the expression of CRYAB and VEGF proteins in canine hemangiosarcomas and relate these findings to the histological grade of the tumors. For this, 35 samples of canine hemangiosarcomas were analyzed. Tumor fragments were evaluated for histological degree of differentiation, necrosis, and mitotic rate. Furthermore, immunohistochemical tests were performed using specific antibodies for VEGF and CRYAB proteins. The slides were evaluated for staining intensity and number of labeled cells. It is concluded that the increase in VEGF expression is not related to an increase in CRYAB expression in canine hemangiosarcomas and that CRYAB is not related to the protective factors modulating the tumor microenvironment expressed by hemangiosarcomas in this species.

Keywords: Immunohistochemistry. Markers. Sarcoma. Angiogenesis

SUMÁRIO

1. Introdução	07
2. Revisão de Literatura	10
2.1. Sarcomas de Tecidos Moles	09
2.2 Hemangiossarcomas	10
2.2. Marcadores Alvo CRYAB e VEGF	12
2.3. Modelos de Estudo	13
2.4. Avaliação histológica	14
3. Material e Métodos	15
4. Resultados e Discussão	17
5. Conclusões	23
Referências	24

1. INTRODUÇÃO

Os sarcomas de tecidos moles (STM) são neoplasias mesenquimais malignas, provenientes de tecidos conjuntivos, neurovascular, muscular, tecido fibroso e células do endotélio vascular, como os vasos sanguíneos (hemangiossarcomas) e vasos linfáticos (linfangiossarcomas). São subdivididos em STM de origem cutânea, subcutânea, e de origem visceral (FERNANDES et al., 2016; JARK et al., 2016).

Os STM constituem um grupo heterogêneo que compreende mais de 50 subtipos histológicos distintos, com comportamentos biológicos diferentes. Na espécie canina, o histotipo mais comum é o hemangiossarcoma, geralmente de caráter multicêntrico e grande potencial metastático, que é comumente descrito nas raças de grande porte como pastor alemão e golden retriever. O baço é geralmente o sítio mais comum, sendo as metástases frequentemente observadas em fígado, omento, mesentério e pulmões (MEUTEN, 2020; DE NARDI, 2016).

Já na espécie humana, em adultos, os histotipos mais comuns incluem lipossarcoma, leiomiossarcoma, sarcoma pleomórfico indiferenciado, fibrossarcoma e sarcoma sinovial. Aproximadamente dois terços de todos os STM em humanos ocorrem nas extremidades, enquanto um terço está localizado no tronco, retroperitônio, abdome ou outros locais (BLAY et al., 2019; KOTILINGAM et al., 2006).

Dentre os desafios no manejo dos STM, encontram-se a alta taxa de mortalidade e formação de metástases associados a esse grupo, a resistência quimioterápica e potencial de recidivas após o término do tratamento e dificuldade em se obter um diagnóstico específico com amostras limitadas de biópsia ou aspiração com agulha fina (SPENCER et al., 2020; HALL et al., 2019; NAKANO et al., 2020; BARBOZA DE NARDI et al. 2023; HORNICK, 2019; MEUTEN, 2020).

Em cães, nota-se uma alta recorrência após a remoção cirúrgica, associada a infiltração local e tendência a disseminação metastática local por via hematogena em mais de 20% dos casos (LIPTAK, FORREST 2013).

O diagnóstico específico dos tumores de tecidos moles é desafiador, considerando a grande quantidade de histotipos existentes e as limitações de amostras disponíveis no paciente *in vivo*, e esse diagnóstico é a chave para o estadiamento, o prognóstico e a seleção da terapia apropriada. Assim, a imunohistoquímica (IHQ) representa grande avanço no diagnóstico patológico: alterações genéticas moleculares subjacentes à patogênese de muitos desses tipos tumorais

podem ser identificadas com marcadores por meio dessa técnica (HORNICK, 2019).

As proteínas “Cadeia B da Proteína Alfa-Cristalina” (CRYAB) e o “Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF)” têm sido examinados como moléculas alvo na progressão tumoral, devido à sua maior expressão estar associada à angiogênese e formação de metástases, e atuando como fator de proteção tumoral para diversos tipos histológicos na espécie humana e canina. Estudos acerca da distribuição e influência dessas moléculas no microambiente tumoral em STM e na espécie canina são escassos, necessitando de maior esclarecimento e documentação (FOSU-MENSAH et al., 2019; MIRANDA, 2019).

Dessa forma, a busca por um marcador tumoral detectável pela IHQ, a compreensão do seu papel na fisiologia celular e sua correlação com as alterações genéticas e expressão gênica são de grande interesse para o estudo de STM, o poderá revelar alvos futuros para terapias oncológicas. Sendo assim, faz-se necessário a validação da espécie canina como modelo experimental, bem como a validação desses marcadores oncológicos na espécie canina. Assim, os objetivos com esse trabalho foram avaliar a expressão CRYAB e VEGF em hemangiossarcomas caninos e relacionar os achados com o grau histológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sarcomas de tecidos moles

Os sarcomas de tecidos moles (STM) recebem classificação e nomenclatura baseada na sua origem, comportamento e morfologia; são neoplasias mesenquimais - semelhantes ao tecido conjuntivo embrionário, mesênquima - que geralmente se originam de fibroblastos, osteoblastos, adipócitos, miócitos e células do revestimento vascular. São um grupo de neoplasias malignas e heterogêneas, que possuem organização celular de forma frouxa, com matriz extracelular abundante (RASKIN; MEYER, 2003).

Os STM representam um desafio na oncologia clínica e cirúrgica; em geral, aproximadamente 25% dos pacientes humanos com STM desenvolvem doença metastática distante, mesmo após a ressecção cirúrgica do tumor primário. Lesões retroperitoneais e intra-abdominais têm uma propensão para recorrência local precoce, com aproximadamente 50% de recorrência nos primeiros cinco anos, seguida por uma progressão contínua que se estende por mais de 20 anos (BRENNAN et al., 2014; BLAY et al., 2019).

Estima-se 13.040 pessoas diagnosticadas com STM nos Estados Unidos em 2018, com aproximadamente 5.150 mortes. Já na China, 3.900 novos casos de STM foram diagnosticados no período de um ano, correspondentes a 1,05% da incidência de câncer total no país. O caráter agressivo da neoplasia se manifesta com uma sobrevida geral documentada de aproximadamente 50% em 5 anos; o principal fator associado à sobrevivência é o controle tanto da recorrência local quanto da disseminação metastática para sítios distantes (BRAY et al., 2018; KOTILINGAM et al., 2006; VON MEHREN et al., 2018; YANG et al., 2019).

De acordo com o Consenso Brasileiro de Diagnóstico e Tratamento de Sarcomas de Tecidos Moles de Extremidades, 2020, acredita-se que no país surgem 3.400 novos casos de STM a cada ano; sua incidência continua aumentando, talvez em decorrência de um melhor reconhecimento e diagnóstico. O estudo associa a ausência de dados oficiais coletados pelos órgãos governamentais à dificuldade do diagnóstico e à descentralização errática no atendimento aos pacientes acometidos por esse tipo neoplásico (SPENCER et al., 2020).

Em levantamento realizado em Campinas, São Paulo, STM representaram 7%

das neoplasias diagnosticadas em crianças e adolescentes num período de dez anos. STM foi o grupo com maior taxa de letalidade: dos casos diagnosticados, 61% resultaram em morte (FRIESTINO et al., 2016).

Quanto à oncologia veterinária, há uma grande escassez de dados epidemiológicos precisos quanto à incidência e sobrevida. Dobson et al. (2002) apontam os STM como o quarto tipo histológico tumoral mais comum em cães, em seu levantamento de 2.546 casos; estima-se uma incidência de 142 casos anuais para cada 100.000 cães (DOBSON et al., 2002; QUARTERMAN, 2020).

Os STM são tumores pseudoencapsulados, com margens pobremente definidas; os tumores de origem cutânea e subcutânea normalmente apresentam baixo potencial metastático. Já os de origem visceral, como os hemangiossarcomas esplênicos e hepáticos, têm alto potencial metastático pela via hematogênica ou por implantação transabdominal (FERNANDES et al., 2016; JARK et al., 2016; DE NARDI et al., 2023).

2.2 Hemangiossarcomas

O hemangiossarcoma é um tipo de STM vascular comum em cães e raro em humanos, tendo maior incidência em cães do que nas outras espécies domésticas. Silveira (2009), destacou em seu levantamento os hemangiossarcomas como o tipo de STM com maior prevalência em cães. Podem ser solitários ou múltiplos e são acometidos principalmente cães idosos e de grande porte (FERNANDES et al., 2016; DE NARDI et al., 2023).

Embora incomum em humanos, com uma ocorrência espontânea menor que 0,001%, o hemangiossarcoma é alvo de estudos nessa espécie por seu perfil agressivo e alto potencial de malignidade (COHEN et al., 2013; GOLDBLUM et al., 2008). Além disso, é alvo de estudos de incidência associada a atividades ocupacionais, com relato de incidência de até 25% em humanos com exposição ocupacional a cloreto de vinila. Uma variedade de produtos químicos, incluindo agentes industriais, agrícolas e farmacêuticos, são considerados potenciais de risco humano para desenvolvimento desse tipo neoplásico (KIELHORN et al., 2000; COOK et al., 2009).

Em humanos e animais, os STM geralmente são manejados com ressecção cirúrgica com margens de segurança e técnicas de controle local, como radioterapia

e eletroquimioterapia; a quimioterapia tem sido empregada como modalidade terapêutica adjuvante em tumores de alto grau, infiltrativos, de grandes dimensões (> 5cm) e com desenvolvimento de metástases distantes. Os protocolos mais empregados incluem uma associação de doxorubicina e ifosfamida, que têm eficiência comprovada em diversos subtipos de STM. Entretanto, os efeitos tóxicos sistêmicos dessas medicações são alvo de estudos, assim como mecanismos de resistência de alguns subtipos tumorais, tais quais os tumores gastrointestinais estromais em humanos, que são resistentes às modalidades de quimioterapia e radioterapia tradicionais (SPENCER et al., 2020; HALL et al, 2019; NAKANO et al., 2020; DE NARDI et al. 2023).

Outra linha de manejo a ser explorada, especialmente para tumores resistentes à quimioterapia convencional, é a terapia com drogas de alvo molecular, que inibem moléculas específicas que possuem uma alta expressão em subtipos tumorais; isso acontece, por exemplo, com a terapia utilizando o inibidor de tirosina quinase (TKI) que tem como alvo o c-kit (CD117), um receptor de membrana que é especificamente expresso nos tumores gastrointestinais estromais e detectado pela imunohistoquímica, e tem apresentado resultados promissores no tratamento desse tipo de STM em humanos (REICHARDT, 2018; HALL et al.; 2019; NAKANO et al.; 2020).

2.3 Marcadores alvo: CRYAB e VEGF

As proteínas cristalinas estão presentes nas células do cristalino dos animais vertebrados, com função estrutural; dentre elas, os grupos alfa, beta e gama ocorrem nos mamíferos. As alfa-cristalinas podem ser induzidas por choque térmico e são membros da família de proteínas de choque térmico (HSP20) (DAI et al, 2022; GHAHRAMANI et al., 2022).

Cadeia A e Cadeia B da proteína alfa-cristalina são proteínas multifuncionais com diversas funções biológicas, que funcionam principalmente como uma chaperona molecular para prevenir a agregação e degradação de proteínas desnaturadas devido ao dano celular resultante de choque térmico, radiação, estresse oxidativo e outros insultos, promovendo assim a sobrevivência celular e prevenindo a apoptose; essas proteínas têm sido alvo de estudos a respeito do seu potencial terapêutico e do seu envolvimento em doenças (NAGARAJ et al., 2016; SHI et al., 2017).

Enquanto os produtos dos genes da Cadeia A são mais restritos ao cristalino,

os produtos da Cadeia B da proteína alfa-cristalina (codificada pelo gene CRYAB) são amplamente expresso em muitos tecidos e órgãos; a sua expressão elevada ocorre em doenças neurológicas e miopatias (DAI et al, 2022; GHAHRAMANI et al., 2022).

Além disso, a CRYAB tem sido alvo de diversos estudos oncológicos, sendo que sua alta expressão está intimamente correlacionada com comportamento e evolução tumoral, surgimento de metástases e menor tempo de sobrevivência em pacientes humanos com câncer gástrico, colorretal, tumores de mama, carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Entretanto, os relatos da expressão dessa molécula em STM e cães são escassos (CHEN et al., 2018; MIRANDA, 2019; SHI et al., 2017).

A CRYAB também está associada à expressão e modulação do fator de crescimento de endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF), tido como principal molécula envolvida na angiogênese. Essa molécula protege o VEGF da degradação intracelular pela modulação do microambiente tumoral e provoca um aumento na secreção deste fator, contribuindo para o desenvolvimento de novos vasos (NAHOMI et al., 2013; MIRANDA, 2019).

O VEGF é amplamente estudado por seus efeitos mitogênicos e anti-apoptóticos nas células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular e promovendo a migração celular, sendo que a sua concentração está associada à malignidade do tumor e pior prognóstico (GUO et al., 2017; MELINCOVICI et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

Foi documentado que cães com hemangiossarcoma apresentaram maiores chances de obter concentrações detectáveis de VEGF quando comparados com cães saudáveis. Porém, neste estudo, não houve correlação entre a concentração plasmática de VEGF e o estadiamento da doença. Objetivando-se o desenvolvimento das terapias com drogas de alvo molecular, o monitoramento do VEGF podem indicar a necessidade do uso de antiangiogênico no manejo dos hemangiossarcomas e determinar o papel diagnóstico e prognóstico dessa molécula detectada pela imunohistoquímica (CLIFFORD et al., 2001; FERNANDES, 2016).

Embora a função e mecanismos de atuação do VEGF na angiogênese tumoral tenham sido vastamente discutidos na oncologia, tornando essa molécula um dos principais alvos terapêuticos e estudos acerca da fisiologia tumoral, busca-se um maior entendimento da sua distribuição no local e sua influência no microambiente tumoral (MELINCOVICI et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

2.4 Modelos de estudo

Sobre a aplicabilidade animal como modelo na imuno-oncologia, a espécie canino é reconhecida pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI) como modelo de tumores de surgimento espontâneo para estudos com linfoma, osteossarcoma, câncer de glândula mamária, melanoma e carcinoma de células escamosas; suínos têm sido empregados como modelos de tumores geneticamente modificados e camundongos especialmente utilizados em estudos com tumores implantados por via subcutânea (GERNER et al., 2009; OVEGAARD et al., 2018).

Os cães têm sido alvo de estudos de estratégias na imunoterapia oncológica, com uso de citocinas vetorizadas virais (câncer cerebral) e administração sistêmica de nanopartículas de IL-12 (sarcoma de tecidos moles); para que estes estudos tenham impacto na imuno-oncologia humana, é necessário que haja rigor na condução dos ensaios clínicos e correlação de biomarcadores oncológicos (CANTER et al., 2017; DOW, 2020).

Sobre o valor e confiabilidade dos modelos animais para humanos em STM, Kakiuchi-Kiyota et al. (2020) observaram em estudo comparativo que os hemangiossarcomas caninos expressam marcadores de células endoteliais em estágio avançado (incluindo VEGF) tal qual humanos, enquanto os hemangiossarcomas de camundongos foram negativos; isso sugere que os tumores de humanos e caninos possam reter maior potencial de diferenciação do que os tumores de camundongos. Assim, o desenvolvimento desses tumores é variável entre espécies e cautela é necessária ao discutir a tradução do risco carcinogênico de modelos animais para humanos.

Muitas neoplasias, incluindo os sarcomas de tecidos moles caninos, compartilham semelhanças impressionantes com as doenças humanas equivalentes, não apenas clínica e histologicamente, mas também em nível molecular e genômico; estudos oncológicos comparativos são vantajosos no entendimento do panorama molecular e comportamento tumoral, bem como no desenvolvimento de novas terapias (LEBLANC e MAZCKO, 2020; NOLAN et al., 2019).

2.5 Avaliação histológica

O diagnóstico histológico de STM, após biópsia incisional, é geralmente feito por coloração IHQ e podem ainda ser feitos, em associação, testes moleculares, como hibridização *in situ* fluorescente ou reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa, bem como anticorpos monoclonais específicos que podem detectar as translocações, mutações e amplificações gênicas recorrentes presentes em certos subtipos histológicos de sarcomas (GAMBOA et al., 2020; HORNICK, 2019).

A graduação tumoral por meio da avaliação histológica deve ser feita em todas as amostras, por seu valor prognóstico. De acordo com a Federação Francesa do Grupo de Centros de Sarcoma (FNCLCC), a graduação tumoral pode ser determinada por três parâmetros: grau de diferenciação, necrose e taxa mitótica (Tabela 1). Em seguida, a pontuação dentro de cada categoria é utilizada para classificar os tumores em outras três categorias principais, de menor a maior grau de sarcoma (Tabela 2). A diferenciação tumoral é o aspecto mais subjetivo deste sistema de pontuação e pode não estar disponível para todos os subtipos histológicos (GAMBOA et al., 2020; TROJANI et al., 1984).

Tabela 1: Parâmetros para determinar grau histológico tumoral de sarcomas

Parâmetro	Definição
Escore de diferenciação	
1	Sarcomas muito semelhantes ao tecido mesenquimal adulto normal
2	Sarcomas para os quais a tipagem histológica é definida
3	Sarcomas embrionários e indiferenciados, sarcomas de tipo duvidoso
Escore de contagem mitótica	
1	0-9 mitoses por 10 *CGA
2	10-19 mitoses por 10 CGA
3	≥20 mitoses por 10 CGA
Necrose tumoral	
1	Sem necrose
2	<50% de necrose tumoral
3	≥50% de necrose tumoral

*CGA = Campo de grande aumento

Fonte: Gamboa et al.(2020)

Tabela 2: Graduação histológica de sarcomas

Grau	Definição
GX	Grau não pôde ser avaliado
G1	Diferenciação total, contagem mitótica e pontuação de necrose de 2 ou 3
G2	Diferenciação total, contagem mitótica e pontuação de necrose de 4 ou 5
G3	Diferenciação total, contagem mitótica e pontuação de necrose de 6, 7 ou 8

Fonte: Gamboa et al. (2020)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações da Legislação Brasileira, as resoluções normativas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI) através da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica, após apreciação e aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV - Protocolo 48/ 2021).

Foram recuperados 35 blocos de amostras de hemangiossarcoma canino do arquivo do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV, provenientes de necropsias realizadas entre os anos de 2017 a 2021.

As informações referentes ao animal e sua condição clínica foram avaliados nas fichas de identificação do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV, assim como as características da massa tumoral: sítio de coleta, aspecto macroscópico, análise histopatológica e histotipo. Neste estudo, não foram considerados raça, idade ou sexo do animal, uma vez que esses critérios não são determinantes quanto ao objetivo do trabalho.

Os blocos de parafina contendo os fragmentos dos tumores foram recuperados do arquivo do laboratório e submetidos à microtomia. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 4µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina e avaliados a microscopia de luz (obj. 10x). As amostras foram graduadas de acordo com o descrito pela Federação Francesa do Grupo de Centros de Sarcoma (FNCLCC) de acordo com o grau de diferenciação, taxa de tecido necrótico e taxa mitótica do tumor – Tabelas 1 e 2 (TROJANI et al., 1984, GAMBOA et al., 2020).

O protocolo de imuno-histoquímica utilizado nesta pesquisa foi o proposto por Miranda (2019). Essa etapa foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Veterinária da UFV. Amostras de hemangioma e de coração de cão foram utilizados como controles positivos para VEGF e CRYAB, respectivamente. Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados com álcool em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70%) e água. Para recuperação antigênica, os cortes foram aquecidos em tampão citrato (pH 8) aquecido a 95°C por dez minutos. Após 30 minutos de resfriamento, foram lavados com água destilada por dois minutos, três vezes. Após essa etapa, foi utilizado o bloqueador de peroxidase (EasyLink One – EasyPath®) por dez minutos; os cortes foram lavados com água

destilada e incubados com o bloqueador de proteína (EasyLink One – EasyPath®) por mais dez minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti- β catenina (Abcam, ab16051), anti-VEGF (diluição 1:100, NB100-664, Novus Biologicals) e anti-CRYAB (diluição 1:250, F-10, Santa Cruz Biotechnology) foram incubados por duas horas a 37°C e lavados três vezes com PBS durante dois minutos cada. Os cortes foram incubados com o polímero EasyLink One (EasyPath®) por 20 minutos, lavados três vezes com PBS por dois minutos e incubados por cinco minutos com o cromógeno DAB. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina; as lâminas foram montadas e avaliadas a microscopia de luz (obj.40). A análise das lâminas foi realizada de forma qualitativa e comparativa, de acordo com a intensidade da marcação e quantidade de células marcadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram diagnosticadas *pos mortem*, em necropsias, o que pode estar relacionado aos desafios de se estabelecer um diagnóstico preciso e precoce de hemangiossarcomas *in vivo* em pacientes veterinários. Isso inclui as limitações em se obter amostras efetivas de biópsia no paciente para realização de um manejo clínico adequado e o potencial agressivo desse tipo tumoral, levando à uma baixa e curta sobrevida dos pacientes, conforme descrito por Hornick (2019).

Em estudo retrospectivo realizado por Kok et al. (2019), não houve diferenças significativas entre fêmeas e machos ou idades predispostas ao acometimento dos STM, mas notou-se predisposição pelas raças de grande porte, como labradores e golden retrievers. Essa associação entre STM e cães de grande porte foi similarmente descrita por Liptak e Forrest (2019), assim como a não relação com o sexo do animal; entretanto, estes descreveram uma tendência de acometimento por cães de meia idade - tendência comum em diversos histotipos neoplásicos além dos hemangiossarcomas.

Dentre as 35 amostras avaliadas, 68,5% foram classificadas no Grau 3 de acordo com a Federação Francesa do Grupo de Centros de Sarcoma (FNCLCC) (TROJANI et al., 1984, GAMBOA et al., 2020). A maior classificação das amostras em Grau III observada neste experimento pode estar associada ao diagnóstico tardio e pior prognóstico dos cães acometidos por STM, tendência observada também em pacientes humanos acometidos por STM e observada por Von Mehren et al. (2018) e Yang et al. (2019). A classificação tumoral em grau estabelecida pela FNCLCC pode ser influenciada pela escolha do sítio de amostra de biópsia pelo patologista ou cirurgião, uma vez que maiores taxas de necrose estão associadas a uma maior graduação e, geralmente, a um pior prognóstico; entretanto, ao selecionar um sítio de amostra representativa para o histopatológico, frequentemente as áreas de necrose são evitadas na coleta para diferenciação celular e para otimizar a tipificação tumoral (TROJANI et al., 1984; FERREIRA, 2008; SANTORO et al., 2008; GAMBOA et al., 2020). Uma vez que, neste trabalho, foram utilizadas amostras do acervo do Laboratório de Patologia da UFV, a escolha do sítio de amostra tumoral por diferentes profissionais do setor pode ter exercido influência ou viés na graduação histológica observada.

De acordo com o Consenso da Associação Brasileira de Oncologia Veterinária sobre Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Hemangiossarcoma Canino, o sistema de graduação tumoral para STM em cães demonstrou não estar relacionada à predição prognóstica e ressalta que novos estudos são necessários para padronização dos critérios para classificação de hemangiossarcomas quando ao grau histopatológico e índice mitótico (DE NARDI et al., 2023). Assim, a graduação histológica como método de avaliação isolado pode não ter valor prognóstico representativo e apresentar maior subjetividade do que quando associado a outros métodos de avaliação, como a imuno-histoquímica.

A imuno-histoquímica com os anticorpos anti-CRYAB e anti-VEGF foi realizada em 28 amostras dos blocos recuperados. As demais amostras foram descartadas por terem sido consideradas inadequadas para a IHQ por falha no processamento. Observou-se que o anticorpo anti-CRYAB não marcou 24 das 28 amostras analisadas de hemangiossarcomas (cerca de 85,7%) (Tabela 3), em comparação com o controle que corou em acentuada quantidade.

Tabela 3 – Distribuição percentual da quantidade e intensidade de células tumorais marcadas por CRYAB e VEGF.

VEGF	AUSENTE	DISCRETO	MODERADO	ACENTUADO
Quantidade	0	3,5	21,4	75
Intensidade	0	21,4	39,2	39,2
CRYAB	AUSENTE	DISCRETO	MODERADO	ACENTUADO
Quantidade	85,7	10,7	3,5	0
Intensidade	85,7	3,5	7,1	3,5

Neste trabalho, não foi observada expressão significativa de CRYAB nos hemangiossarcomas, e infere-se que a expressão de CRYAB não possuiu valor preditivo como marcador de malignidade e valor prognóstico para hemangiossarcomas. Essa observação diverge do estudo conduzido por Rashidieh et

al. (2020), que descreveu uma associação direta entre alta expressão de CRYAB, maior acometimento de hemangiossarcomas e pior prognóstico em ratos; a maior expressão de CRYAB foi então associada à maior potencial metastático e maior neovascularização tumoral nessa espécie. Entretanto, nota-se grande escassez de estudos prévios representativos da associação desse marcador com os STM na espécie canina para critério de comparação. O anticorpo anti-VEGF, por sua vez, marcou todas as 28 amostras, com variação no grau de quantidade e intensidade (Figura 1). Esse achado corrobora com descrições prévias na literatura de tipos de STM que expressavam VEGF associados à maior vascularização e crescimento tumoral na espécie canina (Kakiuchi-Kiyota et. al 2020).

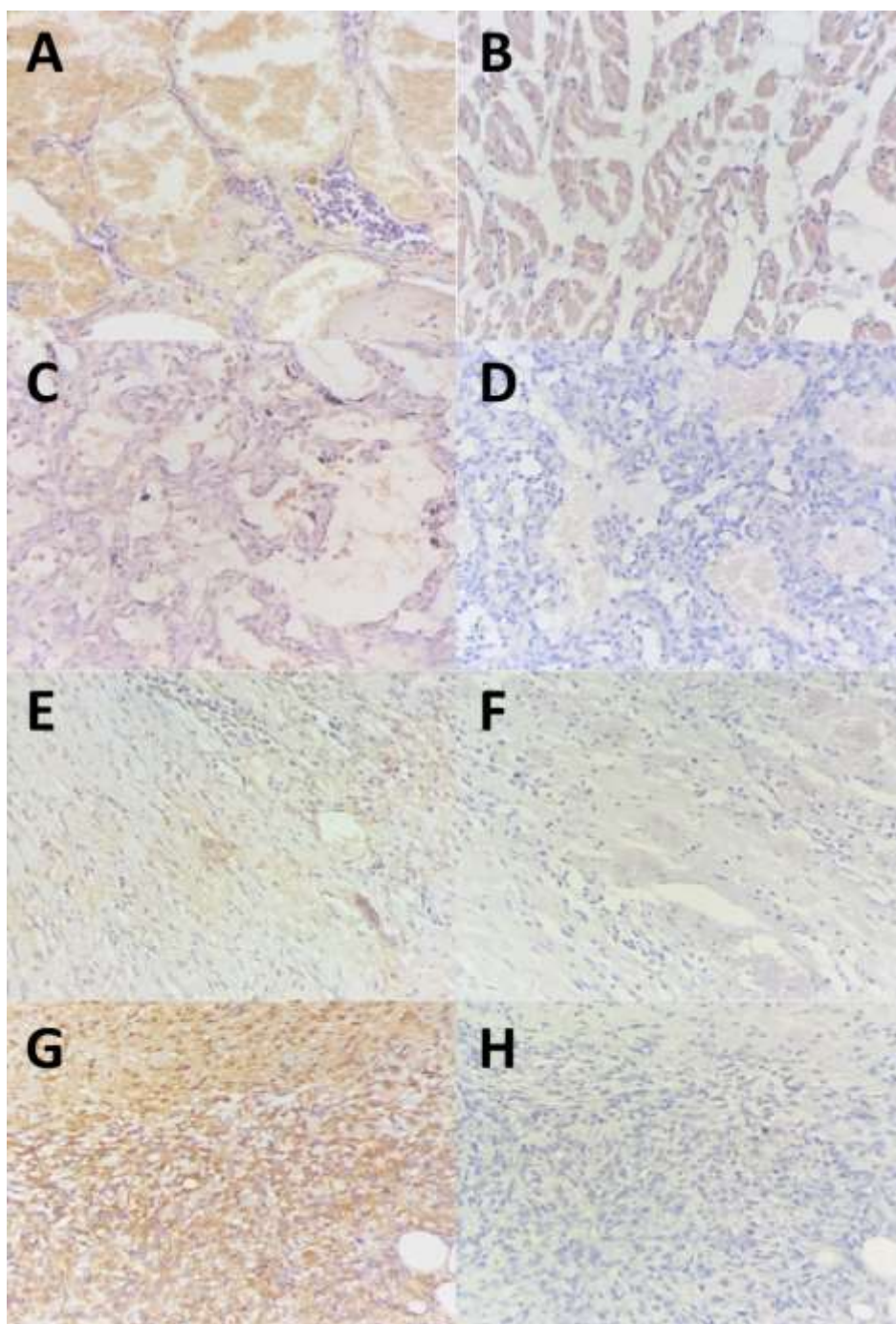


Figura 1 – Micrografias de amostras representativas para diferentes intensidades de imunomarcção para VEGF e CRYAB (obj. 40). A: Hemangioma, como controle positivo para VEGF; B: Coração, como controle positivo para CRYAB; C, E e G: Intensidade de marcação para VEGF baixa, média e alta, respectivamente. D, F e H: Marcação para CRYAB nas mesmas amostras apresentadas em C, E e G.

Campos et. al (2012) observaram em seu estudo uma expressão de VEGF até quatro vezes maior em hemangiossarcomas esplênicos em cães ($P < 0,05$) do que em hemangiomas - tumores vasculares benignos que possuem expressão elevada de VEGF e neovascularização abundante; além disso, os cães que expressavam valores altos de VEGF, acometidos por hemangiossarcomas esplênicos, possuíam valores

baixos de hematócrito e contagem de hemácias mais baixas ($P < 0,05$). Esses achados sugerem que a presença de níveis mais elevados de VEGF pode estar relacionada à proliferação vascular maligna observada nos hemangiossarcomas em cães. O mesmo ocorre com a expressão plasmática de VEGF em cães com hemangiossarcoma, documentada como mais detectável comparada com a expressão plasmática de VEGF em cães saudáveis ($P < 0,01$) (Clifford et. al., 2001).

Ao contrário do observado por Miranda (2019), que notou uma relação direta entre a marcação dos anticorpos anti-VEGF e anti-CRYAB, tanto na quantidade de células quanto na intensidade em tumores de mama de cadelas, em hemangiossarcomas não foi possível observar uma relação direta dos dois anticorpos na marcação.

A CRYAB é uma proteína associada à proteção do VEGF contra a degradação intracelular e associada a um aumento de secreção deste fator; assim, a correlação entre CRYAB e VEGF e o aumento da expressão de ambas as moléculas está relacionado ao desenvolvimento de novos vasos, e à manutenção e evolução tumoral em humanos e cães (NAHOMi et al., 2013; MIRANDA, 2019). A ausência de uma relação direta entre CRYAB e VEGF observada neste trabalho pode indicar que em em hemangiossarcomas caninos a CRYAB não é fator protetor para VEGF e que o aumento da expressão desde, assim como a angiogênese tumoral, não são influenciados pela expressão de CRYAB.

Essa diferença na expressão de fatores tumorais e na marcação dos anticorpos anti-CRYAB pode estar relacionada à origem majoritariamente epitelial observada nas neoplasias mamárias, distinta da origem mesenquimal dos STM; diversos estudos sobre a expressão da cadeia B da proteína alfa-cristalina em tumores de origem epitelial descrevem a transição epitélio-mesênquima como uma das principais vias de invasão e migração tumoral. Por essa via, a maior expressão da cadeia B da proteína alfa-cristalina promove plasticidade das células tumorais epiteliais para células mesenquimais, processo associado à maior formação de metástases secundárias e metástases distantes. Esse mecanismo pode representar uma relação entre a maior expressão desse fator em tumores de origem epitelial e menor expressão em tumores de origem mesenquimal (DAI et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2017; MIRANDA, 2019; SCHI et al., 2017).

Devido ao número reduzido de amostras disponíveis pertencentes ao Grau 1 e Grau 2 utilizados na etapa da imunohistoquímica, não foi possível estabelecer uma

relação entre um maior grau de classificação histológica dos STM e maior marcação de células tumorais pelos anticorpos anti-VEGF e anti-CRYAB.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que o aumento da expressão de VEGF não está relacionado a um aumento da expressão de CRYAB em hemangiossarcomas caninos. Assim, é possível que para a espécie canina a expressão de CRYAB não esteja relacionada aos fatores protetores de modulação do microambiente tumoral expressos pelos hemangiossarcomas.

A CRYAB pode não ser um alvo para estudos acerca de progressão tumoral, terapias de alvo molecular e mecanismos de resistência a quimioterápicos dos hemangiossarcomas caninos.

Uma vez que este trabalho abordou hemangiossarcomas caninos, mais estudos em outros subtipos de STM são necessários para concluir que essa falta de correlação entre CRYAB e VEGF se aplicam a STM caninos em geral.

REFERÊNCIAS

ARRIGO, A.P.; SIMON, S.; GIBERT, B.; KRETZ-REMY, C; NIVON, M; CZEKALLA, A; GUILLET, D; MOULIN, M; DIAZ-LATOUD, C; VICART, P. Hsp27 (HspB1) and α Bcrystallin (HspB5) as therapeutic targets. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.581, p.3665–3674, 2007.

BENJAMIN, A.S.; LEE, A.C.; SAUNDERS, W.J. Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles. **Veterinary Pathology**, v.36, p.423-436, 1990.

BLEVINS, W.E. Ultrasonography for cancer diagnosis and monitoring. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. 2 ed. cp. 40 Teton New Media, Jackson, 2002, p. 565-572.

BOSLOOPER, K.; KING-YIN LAM, A.; GAO, J.; WEINSTEIN, S; JOHNSON, N. The clinico-pathological roles of alpha-B-crystallin and p53 expression in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Pathology**, v.40, p.500–504, 2008.

BRODEY, R.S.; FIDLER, I.J. Clinical and pathologic findings in bitches treated with progestational compounds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.149, p.1406–15, 1966.

CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A.; MELGAÇO DE FARIA, J.C.; GUIMARÃES, JE; DUTRA, Á.P.; FERREIRA, E; DE SOUSA, L.P.; RABELO, É.M.L.; VIEIRA DA COSTA, A.F.D.; CASSALI, G.D. CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.26, p.1383-1388, 2012.

CAMPOS, A. G.; CAMPOS, J. A. D. B.; SANCHES, D. S., DAGLIE, M.L.Z; MATERA, J.M. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in splenic hemangiomas and hemangiosarcomas in dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, n. 4, 2012.

CANTER, R.J.; GROSSENBACHER, J.K.; FOLTZ, J.A.; STURGILL, I.R.; PARK, J.S.; LUNA, J.I.; KENT, M.S.; CULP, W.T.N.; CHEN, M.; MODIANO, J.F.; MONJAZEB, A.M.; LEE, D.A.; MURPHY, W.J. Radiotherapy enhances natural killer cell cytotoxicity and localization in pre-clinical canine sarcomas and first-in-dog clinical trial. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v.5, p.98, 2017.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**. v.473, 2011.

CARTANA, E.T.; GHEONEA, D.I.; CHERCIU, I.F.; STREAȚĂ, I; USCATU, C.D; NICOLI, E.R; IOANA, M.; PIRICI, S.; GEORGESCU, G.V.; ALEXANDRU, D.O.; SURLIN, V.; GRUIONU, G.; SĂFTOIU, A. Assessing tumor angiogenesis in colorectal cancer by quantitative contrast-enhanced endoscopic ultrasound and molecular and immunohistochemical analysis. **Endoscopic Ultrasound**, v.7, p.175-183, 2018.

CARVALHO, C.F. **Ultrassonografia Doppler em Pequenos Animais**. São Paulo: Roca. 2009. 274p.

CASSALI, G.D. **Patologia mamária canina: Do diagnóstico ao tratamento**. São Paulo: Editora MedVet, 2017. 224 p.

CLIFFORD, C. A.; HUGHES, D.; BEAL, M. W.; MACKIN, A. J.; HENRY, C. J.; SHOFER, F. S.; SORENMO, K. U. Plasma vascular endothelial growth factor concentrations in healthy dogs and dogs with hemangiosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, n.2, p. 131-135, 2001.

COOK. Hemangiosarcoma in Rodents: Mode-of-Action Evaluation and Human Relevance, **Toxicological sciences**, v.111, n.1, p. 4-18, 2009.

DAI, A.; SUN, Q. CRYAB and tumors. **Journal of International Oncology**, 351-354, 2020.

DAI, A.; GUO, X.; YANG, X.; LI, M.; FU, Y.; SUN, Q. Effects of the CRYAB gene on stem cell-like properties of colorectal cancer and its mechanism. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.18, n.5, p.1328-1337, 2022.

DAVALOS, A.R.; COPPE, J.P.; CAMPISI, J.; DESPREZ, P.Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.29, p.273-283, 2010.

DE NARDI, A.B.; DE OLIVEIRA MASSOCO SALLES GOMES, C.; FONSECA-ALVES, C.E.; et al. **Diagnosis, Prognosis, and Treatment of Canine Hemangiosarcoma: A Review Based on a Consensus Organized by the Brazilian Association of Veterinary Oncology**, ABROVET, *Cancers* 2023, v. 15, n. 7, 2025.

DEN ENGELSMAN, J.; VAN DE SCHOOTBRUGGE, C.; YONG, J.; PRUJIN, G.J.M.; BOELENS, W.C. **Pseudophosphorylated alphaB-crystallin is a nuclear chaperone imported into the nucleus with help of the SMN complex**. *PLoS One*. N.9: e73489. 2013.

DOCK, W.; GRABENWOGER, F.; METZ, V.; et al. Tumor vascularization: assessment with Duplex Sonography. **Radiology**, v.181, n.1, p.241–244, 1991.

DOW, S. A role for dogs in advancing cancer immunotherapy research. **Frontiers in immunology**, v.10, n. 2935, p. 293, 2020.

ELAIMY, A.; MERCURIO, A.M. Convergence of VEGF and YAP/TAZ signaling: Implications for angiogenesis and cancer biology. **Science Signaling**., v.11, n. 552, 2018.

FELICIANO, M.A.R.; USCATEGUI, R.A.R.; MARONEZI, M.C.; et al. Ultrasonography methods for predicting malignancy in canine mammary tumors. **PLoS One**, v.12, n. 5, 2017.

FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.; SILVA, M.A. Conventional and Doppler ultrasound for the differentiation of benign and malignant canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, n. 6 p.332–337, 2012.

FERNANDES, S.C.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos. 2ª ed.** Grupo Gen-Editora Roca Ltda., p. 531-543, 2016.

FERREIRA, L. F. G. R. B. **Estudo comparativo entre análises citológica e histopatológica no diagnóstico de tumores de canídeos.** Bachelor's thesis. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, 2008.

FINLAY, T.M.; PALMER, A.L.; OUSMAN, S.S. Murine neutrophils treated with alpha B-crystallin reduce IL-2p40 production by dendritic cells. **Immunology**, v.155, n.1, p.72–84, 2018.

FOSU-MENSAH, N.A.; JIANG, W.; BRANCALE, A.; CAI, J.; WESTWELL, A.D. The Discovery of purine-based agents targeting triple-negative breast cancer and the α B-crystallin/VEGF protein-protein interaction. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, p.182 - 202, 2018.

GAMBOA, A. C.; GRONCHI, A.; CARDONA, K. Soft-tissue sarcoma in adults: an update on the current state of histiotype-specific management in an era of personalized medicine. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 3, p. 200-229, 2020.

GHARHAMANI, M.; SHAHSAVANI, M. B.; YOUSEFI, R. Increased chaperone activity of human α B-crystallin with incomplete oxidation as a new defense mechanism against oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1870, n.7, p.140794, 2022.

GERNER, W.; KÄSER, T.; SAALMÜLLER, A. Porcine T lymphocytes and NK cells- an update. **Developmental e Comparative Immunology**, v.33, n.3, p.310-320, 2009.

GIANNI-BARRERA, R.; TRANI, M.; REGINATO, S.; BANFI, A. To sprout or to split? VEGF, Notch and vascular morphogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 6, p. 1644-1648, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFRER, F.S.; SMELSTOYS, J.A. Neoplastic lesions of the mammary gland. In: MOHR, U.; CARLTON W.W.; DUNGWORTH, D.L.; BENJAMIN S.A.; CAPEN C. C.; HAHN F.F. Pathobiology of the Aging Dog. Ames, IA: **Iowa State University Press**, p.168–178, 2001.

GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.H.; PEÑA, L.; ZAPPULLI, V. Tumors of the mammary gland. In: **MEUTEN, D.J. Tumors in domestic animals**. 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017. p.723-765.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, p.646–674, 2011.

HALL, F.; VILLALOBOS, V.; WILKY, B. Future directions in soft tissue sarcoma treatment. **Current Problems in Cancer** , v. 43, n. 4, p. 300-307, 2019.

HOLCAKOVA, J.; HERNYCHOVA, L.; BOUCHAL, P.; BROZKOVA, K.; ZALOUDIK, J.; VALIK, D. NENUTIL, R.; VOJTESEK, B. Identification of α B-crystallin, a biomarker of renal cell carcinoma by SELDI-TOF MS. **International journal of biological markers**, v.23, n.1, p.48-53, 2008.

HORTA, R.S.; COSTA, M.P.; LAVALLE, G.E.; et al. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com auxílio da imunohistoquímica. **Ciência Rural**, v.42, n.6, p.1033-1039, 2012.

IWAKI, T.; WISNIEWSKI, T.; IWAKI, A.; CORBIN, E.; TOMOKANE, N.; TATEISHI, J.; GOLDMAN, E. Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. **The American journal of pathology** , v.140, n.2, p.345-356, 1992.

JARK, P. C.; FILHO, N. P. R; FERREIRA, M. G. P. A; et. al. in DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos**, 2ª ed, Grupo Gen-Editora Roca Ltda., p. 517-530, 2016.

KAKIUCHI-KIYOTA, S.; OBERT, L. A.; CROWELL, D. M.; XIA, S.; ROY, M.D.; COSKRAN, T.M.; KREEGER, J.M.; CRABBS, T.A.; COHEN, S.M.; CATTLE, R.C.; COOK, J.C. Expression of hematopoietic stem and endothelial cell markers in canine hemangiosarcoma. **Toxicologic Pathology**, v.48, n.3, p.481-493, 2020.

KIELHORN, J.; MELBER, C.; WAHNSCHAFFE, U.; AITIO, A.; MANGELSDORF, I. **Vinyl chloride: Still a cause for concern**. Environ. Health Perspect., v.108, p.579-588, 2000.

KESHAVARZ, E.; MEHRJARDI, M.Z.; KARIMI, M.A.; VALIAN, N.; KALANTARI, M.; VALIAN, K. Diagnostic Value of Spectral Doppler Ultrasound in Detecting Breast Malignancies: An Original Article. **International Journal of Cancer Management**, v. 11, n. 2, 2018.

LANA, S.E.; RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J. & VAIL, D.M., Withrow & MacEwen's **Small Animal Clinical Oncology** 4.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p.619-636.

LEE, C.G.; LINK, H.; BALUK, P.; HOMER, R.J.; CHAPOVAL, S.; BHANDARI, V.; KANG, M.J.; COHN, L.; KIM, Y.K.; McDONALD, D.M.; ELAS, J.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. **Nature Medicine**, v.10, n.10, p.1095–1103, 2004.

LEWIS, C. E.; LEEK, R.; HARRIS, A. L.; MCGEE, J. O'D. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 57, n. 5, p. 747-751, 1995.

LIPTAK, J.M.; FORREST, L.J. Soft Tissue Sarcomas. In: Eds WITHROW, S.J., VAIL, D.M.; PAGE, R.L. **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5.ed., cp.21. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 356-380.

LISSBRANT, I.F.; STATTIN, P.; WIKSTROM, P.; DAMBER, J.E.; EGEVAD, L.; BERGH, A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. **International Journal of Oncology**, v. 17, n. 3, p. 445-496, 2000.

MAGALHÃES, L.F., MAGALHÃES, G.M., CALAZANS, S.G., CRIVELLENTI, L.Z., LIMA, G.P.; MEDEIROS-RONCHI, A.A. Imunomarcção da transição epitélio-mesênquima na neoplasia mamária primária de cadelas e sua metástase em linfonodo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, 1479-1482, 2017.

MALIN, D.; STREKALOVA, E.; PETROVIC, V.; et al. AlphaB-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 56-67, 2014.

MALOYAN, A.; SANBE, A.; OSINSKA, H.; WESTFALL, M.; ROBINSON, D.; IMAHASHI, K.; MURPHY, E.; ROBBINS, J. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in α -B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. **Circulation**. v.112, n.22, p.3451-3461, 2005.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549-555, 2002.

MARINACCIO, C.; INGRAVALLO, G.; GAUDIO, F.; PERRONE, P.; NICO, B.; MAOIRANO, E.; SPECCHIA, G.; RIBATTI, D. Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma. **Leukemia research**, v.

38, n. 11, p. 1374-1377, 2014.

MASILAMONI, J.G.; JESUDASON, E.P.; BHARATHI, S.N.; JAYAKUMAR, R. The protective effect of alpha-crystallin against acute inflammation in mice. **Biochim Biophys Acta**, v.1740, n. 3, p.411-20, 2005.

MILANTA, F.; CANESCHI, V.; RESSEL, L. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 1, p. 36-42, 2010.

MIRANDA, J.L. **Expressão de alfa-b cristalina em tumores mamários caninos e sua relação com angiogênese**. 2019. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

MISDORP, W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. **Acta endocrinologica**, v. 125, p. 27-31, 1991.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4 ed. Ames, Blackwell, 2002, p. 575-606.

MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. **Journal of Reproduction and Fertility Supply**, v.57, p.439-443, 2001.

NAGARAJ, R. H.; NAHOMI, R.B.; MUELLER, N.H.; RAGHAVAN,C.T.; AMMAR, D.A.; PETRASH, J.M. Therapeutic potential of α -crystallin. **Biochim Biophys Acta**, v.1860, n.1, p.252–257, 2016.

NAHOMI, R.B.; WANG, B.; RAGHAVAN, C.T.; DOSEFF, A.I.; SANTHOSHKUMAR, P.; NAGARAJ, R.H. Chaperone peptides of alpha-crystallin inhibit epithelial cell apoptosis, protein insolubilization, and opacification in experimental cataracts. **Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.18, p.13022–13035, 2013.

NISHIZUKA, I.; ICHIKAWA, Y.; ICHIKAWA, T.; KAMIYAMA, M.; HASEGAWA, S.; MOMIYAMA, N.; MIYAZAKI, K.; SHIMADA, H. Matrylisin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. **Cancer letters**, v. 173, n. 2, p. 175-182, 2001.

NYMAN, H.T.; NIELSEN, O.L.; MCEVOY, F.J.; LEE, M.H.; MARTINUSSEN, T.; HELLMEN, E.; KRISTENSEN, A. Comparison of B-mode and Doppler ultrasonographic findings with histologic features of benign and malignant mammary tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.6, p.985-991, 2006.

OVERGAARD, N. H.; Fan, T.M.; SCHACHTSCHNEIDER, K.M.; PRINCIPE, D.R.; SCHOOK, L.B.; JUNGENSEN, I. Of mice, dogs, pigs, and men: choosing the appropriate model for immuno-oncology research. **ILAR journal**, v.59, n.3, p.247-262, 2018.

PEDROSO, T.C.; FACCO, G.G.; KUIBIDA, K.V. et al. Neoplasias mamárias diagnosticadas em pequenos animais no serviço de histopatologia do laboratório veterinário Diagno Vet entre 2005 e 2010: Estudo retrospectivo. XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária. 2011.

PEÑA, L.; DE ANDRES, P.J.; CLEMENTE, M.; CUESTA, P.; PÉRES-ALENZA, M.D. Prognostic value of histological grading in noninflammatory canine mammary carcinomas in a prospective study with two-year follow-up: Relationship with clinical and histological characteristics. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 94-105, 2013.

QUINLAN, R. Cytoskeletal competence requires protein chaperones. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v.28, p.219-233, 2002.

RAFFAGHELLO, L.; VACCA, A.; PISTOIA, V.; RIBATTI, D. Cancer associated fibroblasts in hematological malignancies. **Oncotarget**, v.6, n.5, p.2589-2603, 2014.

RASHIDIEH, B.; BAIN, A.L.; TRIA, S.M.; SHARMA, S.; KHANNA, K.K. Alpha-B-Crystallin overexpression is sufficient to promote tumorigenesis and metastasis in

mice. **Experimental Hematology & Oncology**, v.12, p.4, 2023.

RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. **Citologia de Cães e Gatos: atlas colorido e guia de interpretação**. Elsevier Brasil, 2ª ed, p. 72, 2012.

REICHARDT, P. The Story of Imatinib in GIST - a Journey through the Development of a Targeted Therapy. **Oncology Research and Treatment**, v. 41, n. 7-8, p. 472-477, 2018.

RIBATTI, D. Inflammation and Angiogenesis. **Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing**, 2017.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Susceptibility of the Mammary Gland to Carcinogenesis. **The American Journal of Pathology**, v.113, n.1, p.497-512, 1980.

SANTORO, I.L.; RAMOS, R.P. Proposta de revisão de estadiamento do carcinoma de pulmão de células não-pequenas para a sétima edição da classificação tnm dos tumores malignos. **Oncologia Torácica**, v.21, n.1, p.6, 2008.

SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer. **Cancer**, v.26, n. 2, p.419-426, 1970.

SELGEN, D.; ENGEL, A.G. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v.54, n.6, p.804-810, 2003.

SHINOHARA, H.; INAGUMA, Y.; GOTO, S., INAGAKI, T., KATO, K. Alpha B-crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Science**, v.119, n.2, p.203-208, 1993.

SILVEIRA, M. F. **Avaliação da microdensidade vascular como fator prognóstico em sarcomas de tecidos moles em pequenos animais**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

SORENMO, K.U.; DEANNA, R.W.; GOLDSMIDT, R.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. 5ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2013, p.553-571.

SHI, C.; YANG, X.; BU, X.; HOU, N.; CHEN, P. Alpha B-crystallin promotes the invasion and metastasis of colorectal cancer via epithelial-mesenchymal transition. **Biochemical and biophysical research communications**, v.489, n.4, p.369-374, 2017.

SPENCER, R.S.M.S.S.B.; CAMARGO, V.P.; SILVA, M.L.G.; et al. Brazilian consensus on the diagnosis and treatment of extremities soft tissue sarcomas. **Journal of Surgical Oncology**, v.121, n.5, p. 743-758, 2020.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The impact of the immune system on tumor angiogenesis and vascular remodeling. **Frontiers in Oncology**, v.4, p.69, 2014.

TANG, Q.; LIU, Y.F.; ZHU, X.J. et al. Expression and prognostic significance of the alpha B-crystallin gene in human hepatocellular carcinoma. **Human Pathology**, v.40, n.3, p.300-305, 2009.

TROJANI, M.; CONTESSO G.; COINDRE, J.M. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. **International journal of cancer**, v. 33, n. 1, p. 37-42, 1984.

VAN DE SCHOOTBRUGGE, C.; SCHULTS, E.M.J.; BUSSINK, J.; BOELENS, W.C. Effect of hypoxia on the expression of α B-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v.14, 2014.

VAUPEL, P. Tumor Microenvironmental Physiology and Its Implications for Radiation Oncology. **Seminars in Radiation Oncology**, v.14, n.3, p.198-206, 2004.

WANG, W.; LENG, T.; ZHANG, L.; YU, L. Correlation of VEGF expression with transvaginal color Doppler ultrasound blood flow parameters, angiogenesis, and

cancer cell proliferation activity in patients with ovarian cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.11, p.13763-13768, 2018.

WEISS, S.W.; GOLDBLUM, J.R. Malignant vascular tumors. In: WEISS, S. W.; GOLDBLUM, J. R. (Eds.). **Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors**, 5th ed. China: Mosley Elsevier, 2008b, pp. 703–732.

WERNER, P.R.; WERNER, J. Avaliação histopatológica. In: DALECK, C.R. et al. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009, p.121-134.

ZHANG, X.; KELARIA, S.; KERSTETTER, J.; WANG, J. The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. **Journal of Gastrointestinal Oncology**, v.10, n.3, p.307–313, 2019.