

JÉSSICA LELIS DE MIRANDA

**EXPRESSÃO DE ALFA-B CRISTALINA EM TUMORES MAMÁRIOS  
CANINOS E SUA RELAÇÃO COM ANGIOGÊNESE**

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*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M672e  
2019  
Miranda, Jéssica Lelis de, 1991-  
Expressão de alfa-b cristalina em tumores mamários  
caninos e sua relação com angiogênese / Jéssica Lelis de  
Miranda. – Viçosa, MG, 2019.  
vi, 35 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Fabrício Luciani Valente.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-35.

1. Cães - Doenças. 2. Tumores - Fisiologia.  
3. Imuno-histoquímica. 4. Proteínas de choque térmico.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

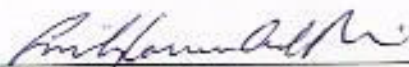
CDD 22. ed. 636.70896994


JÉSSICA LÉLIS DE MIRANDA

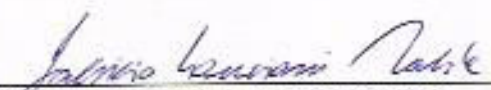
**EXPRESSÃO DE ALFA-B CRISTALINA EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS  
E SUA RELAÇÃO COM ANGIOGÊNES**

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: 15 de fevereiro de 2019.

  
Emily Correna Carlo Reis

  
Gabriel Domingos Carvalho

  
Fabrício Luciani Valente  
(Orientador)

## RESUMO

MIRANDA, Jéssica Lelis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Expressão de alfa-b cristalina em tumores mamários caninos e sua relação com angiogênese.** Orientador: Fabrício Luciani Valente.

Tumores mamários são as neoplasias mais frequentes em cadelas, sendo que em até 90% dos casos correspondem a processos malignos. A retirada cirúrgica com margens é o tratamento mais eficaz para tal enfermidade, porém na maior parte dos casos podem ocorrer recidivas e metástases. Mesmo com indicações clínicas, como tamanho da massa e velocidade de evolução, a histopatologia ainda é o método determinante para classificação de malignidade. A alfa-b cristalina (CRYAB) é membro da família de proteínas de choque térmico e sua relação com a oncogênese vem sendo estudada recentemente, vinculada principalmente com a evolução da doença. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão de CRYAB em tumores mamários caninos e correlacionar os achados com a angiogênese. Para isso, foram coletados dados de 31 animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, realizados exames ultrassonográficos em modo B e Doppler para avaliação das massas, remoção cirúrgica e avaliação microscópica das neoplasias, classificando-as. Cortes histológicos também foram utilizados para reação de imuno-histoquímica (IHQ) com anticorpos anti-VEGF e anti-CRYAB, analisados de acordo com a quantidade de células marcadas e a intensidade da marcação. As variáveis qualitativas foram analisadas por teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, conforme o caso. A comparação das variáveis ultrassonográficas, do tumor e da avaliação microscópica foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, teste t de Student, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Houve correlação entre dados clínicos dos animais (faixa etária, porte, uso de anticoncepcionais, castração, gestações prévias, estadiamento

clínico), dados do tumor (malignidade, pleomorfismo, formação tubular, número de mitoses, graduação histológica), dados ultrassonográficos (ecotextura, índice de resistividade, velocidades média, máxima e mínima) e da IHQ (quantidade e intensidade de VEGF e CRYAB, além da marcação de macrófagos). A expressão de CRYAB está relacionada com dados clínicos e ultrassonográficos, além da expressão de VEGF e angiogênese.

## ABSTRACT

MIRANDA, Jéssica Lelis, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Expression of alpha-b crystalline in mammary tumors and its correlation with angiogenesis.** Advisor: Fabrício Luciani Valente.

Mammary tumors are the most frequent neoplasias in bitches, and in up to 90% of cases they correspond to malignant processes. Surgical removal with margins is the most effective treatment for such disease, but in most cases relapses and metastases may occur. Even with clinical indications, such as mass size and rate of evolution, histopathology is still the determining method for malignancy classification. The alpha-b crystalline (CRYAB) is a member of the family of thermal shock proteins and its relation with oncogenesis has been studied recently, mainly linked to the evolution of the disease. The aim of this work is to evaluate the expression of CRYAB in canine mammary tumors and to correlate the findings with angiogenesis. For this purpose, data were collected from 31 animals treated at the Veterinary Hospital of the Federal University of Viçosa, performing ultrasound examinations in B and Doppler mode for evaluation of masses, surgical removal and microscopic evaluation of the neoplasms, classifying them. Histological sections were also used for immunohistochemistry (IHC) reaction with anti-VEGF and anti-CRYAB antibodies, analyzed according to the number of labeled cells and the intensity of labeling. Qualitative variables were analyzed by the chi-square test or Fisher's exact test, as the case may be. The comparison of ultrasound, tumor and microscopic evaluation was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, Student's t-test, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant. There was a correlation between the clinical data of the animals (age range, size, contraceptive use, castration, previous pregnancies, clinical staging), tumor data (malignancy, pleomorphism, tubular formation, number of mitoses, histological grade), ultrasonographic data, index of resistivity, mean, maximum and minimum velocities) and of

IHC (quantity and intensity of VEGF and CRYAB, in addition to macrophage marking). The expression of CRYAB is related to clinical and ultrasonographic data, as well as the expression of VEGF and angiogenesis.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Neoplasia mamária.....	2
2.2 Angiogênese tumoral.....	6
2.3 Alfa-b cristalina.....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Tumores mamários em cães são as neoplasias mais comuns relatadas em fêmeas, sendo até 90% correspondentes a processos malignos. O tratamento de maior eficácia é a remoção cirúrgica das massas juntamente com o linfonodo, todavia recidivas e metástases são comuns (Campos et al., 2012). Achados clínicos como ulceração do tumor, crescimento rápido e dimensões relativamente grandes são compatíveis com malignidade, porém a ferramenta diagnóstica confirmativa é o exame histopatológico, que pode ser associado à realização de imuno-histoquímica (IHQ) para auxiliar no diagnóstico, na avaliação de metástases e na determinação do prognóstico (Goldschmidt et al., 2017).

Outros exames podem auxiliar a avaliação de tumores mamários, como a radiografia e a ultrassonografia. Esta é um dos exames de imagem frequentemente utilizado na rotina clínica para detecção de metástases e avaliação dos tumores de forma não invasiva. Diversos estudos sugerem a utilização dessa ferramenta para prever o diagnóstico, devido ao baixo custo e fácil acesso, entretanto sua sensibilidade e especificidade tem ampla variação, considerando, por exemplo, o tamanho dos nódulos e a vascularização presente (Feliciano et al., 2012; Feliciano et al., 2017; Keshavarz et al., 2018).

A alfa-b cristalina (CRYAB) é uma molécula que recentemente vem sendo correlacionada com o comportamento tumoral, principalmente em relação ao desenvolvimento de metástases e angiogênese em humanos (Malin et al., 2014). Entretanto, a associação da expressão dessa proteína e a agressividade dos tumores em medicina veterinária ainda não é totalmente elucidada.

Assim, considerando que a análise da expressão de CRYAB pode ter valor prognóstico e/ou preditivo, o objetivo deste trabalho é correlacionar sua expressão com parâmetros de malignidade nas neoplasias mamárias caninas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Neoplasia mamária

Os tumores da glândula mamária representam a neoplasia mais frequente encontrada em cadelas no Brasil, sendo que 60% desses acontecem em mais de uma mama e aproximadamente 90% correspondem a lesões malignas. (Benjamin et al., 1999; Cassali, 2017). Acometem principalmente fêmeas com média de 9 anos de idade e não há predisposição racial. Com o aumento da expectativa de vida dos animais e o controle de doenças infecciosas, tais neoplasias representam uma das maiores causas de óbito de animais idosos na medicina veterinária (Werner e Werner, 2009; Pedroso et al., 2011).

Além de ser uma doença importante na espécie, os cães são considerados bons modelos de estudo das neoplasias mamárias devido à semelhança com a enfermidade que ocorre em humanos. Como a biologia e comportamento dos tumores têm afinidade entre as duas espécies, existem várias associações principalmente quando se trata do prognóstico e tratamento dessa doença (Moe, 2001).

O diagnóstico clínico na medicina veterinária é realizado através da visualização e palpação de nódulos localizados na região das glândulas mamárias, mais comumente em mamas inguinal e abdominal caudal, devido à maior quantidade de parênquima nessas mamas. O estadiamento pode ser definido de acordo com o sistema TNM, no qual se avalia o tamanho do nódulo (T), se há acometimento de linfonodos axilares ou inguinais (N) e a detecção de metástases distantes por exames de imagem (M) em órgãos como pulmões, baço, adrenais e encéfalo (Misdorp, 2002) (Tabela 1). Esses parâmetros ajudam a determinar a conduta terapêutica e o prognóstico do animal (Sorenmo et al., 2013).

**Tabela 1.** Estadiamento TNM de tumores de glândula mamária canina (adaptado de Sorenmo et al., 2013).

<b>Estágio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
I	T1 (< 3 cm)	N0	M0
II	T2 (3 – 5 cm)	N0	M0
III	T3 (> 5 cm)	N0	M0
IV	T (1,2 ou 3)	N1	M0
V	T(1,2 ou 3)	N (0 ou 1)	M1

N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais. M0: Ausência de metástases distantes.  
 N1: Metástase em linfonodos regionais. M1: Metástases distantes detectadas.

Atualmente, vários métodos são utilizados para detecção de metástases, sendo a ultrassonografia e a radiografia os mais comuns. A ultrassonografia é um método de diagnóstico por imagem utilizado para detecção de metástases e avaliação dos nódulos e, por ser uma técnica não invasiva e de custo relativamente baixo, é amplamente utilizada na rotina clínica, visando a determinação de prognóstico e a conduta terapêutica (Blevins, 2002).

Alguns autores relatam o uso do ultrassom em modo B e modo Doppler na avaliação das características dos tumores, como ecogenicidade, margens e vascularização, porém são escassos os trabalhos que correlacionam os achados ultrassonográficos com a análise histológica dos tumores mamários (Nyman et al., 2006; Lana et al., 2007; Feliciano et al., 2012). Esta ferramenta também pode ser utilizada para avaliar a evolução da doença de acordo com o tratamento quando aliado a outros parâmetros (Cârtână et al., 2018).

O tratamento cirúrgico é o mais efetivo, porém, metástases e recidivas são comuns e diminuem a expectativa de vida do animal (Campos et al., 2012). Mesmo com sinais clínicos sugestivos de malignidade, como crescimento rápido, as dimensões e ulceração da massa, a avaliação histopatológica é imprescindível para classificação e graduação do tumor. Tal classificação se dá baseada na experiência do patologista, já que há uma variação ampla dos tipos histológicos que

podem ser encontrados, inclusive na mesma massa (Goldschmidt et al., 2017; Cassali, 2017) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Classificação histológica de nódulos mamários (Goldschmidt et al., 2011).

### **Lesões Não Neoplásicas**

Hiperplasia	Epiteliose
Ductal	Papilomatose
Lobular	

### **Neoplasias Epiteliais**

<b>Malignas</b>	Carcinoma papilar intraductal
Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma de células escamosas
Carcinoma simples	Carcinoma mucinoso
Tubular	Carcinoma rico em lipídeos
Tubulopapilar	<b>Benignas</b>
Carcinoma – invasivo	Adenoma – simples
micropapilar	Adenoma papilar intraductal
Carcinoma sólido	Adenoma ductal
Carcinoma anaplásico	Diferenciação escamosa
Carcinoma misto	Fibroadenoma
Comedocarcinoma	Mioepitelioma
Carcinoma em tumor misto	Tumor misto benigno
Carcinoma ductal	

### **Neoplasias Mesenquimais**

Fibrossarcoma
Osteossarcoma
Condrossarcoma
Hemangiossarcoma

### **Carcinossarcoma**

A graduação das neoplasias é utilizada não só para determinação do prognóstico, mas também facilitar a interpretação histológica. Em

conjunto com o diagnóstico, torna-se um elemento preditivo para a biologia desses tumores. A determinação do grau dá-se pela análise de três características: formação tubular, pleomorfismo celular e a quantidade de figuras mitóticas em 10 campos de maior aumento (Peña et al., 2013) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Graduação histológica de tumores mamários caninos. (Peña et al., 2013)

<b>Característica</b>	<b>Pontuação</b>
<b>A. Formação tubular*</b>	
> 75%	1
10 – 75%	2
< 10%	3
<b>B. Pleomorfismo celular</b>	
Discreto	1
Moderado	2
Acentuado	3
<b>C. Mitoses **</b>	
0 – 9	1
10 – 19	2
> 20	3
<b>Total (A + B + C)</b>	<b>Grau</b>
3 - 5	I
6 - 7	II
8 - 9	III

\* Porcentagem de formação de túbulos.

\*\* Contagem do número de mitoses em 10 campos de maior aumento.

A imuno-histoquímica (IHQ), utilizada de forma rotineira na medicina humana, vem sendo empregada na identificação de receptores e moléculas para auxiliar na classificação dos tumores, na detecção de metástases e no estabelecimento do prognóstico dos animais. Além da avaliação da proliferação celular, a angiogênese também tem sido alvo de estudo visando a determinação de fatores prognósticos e preditivos.

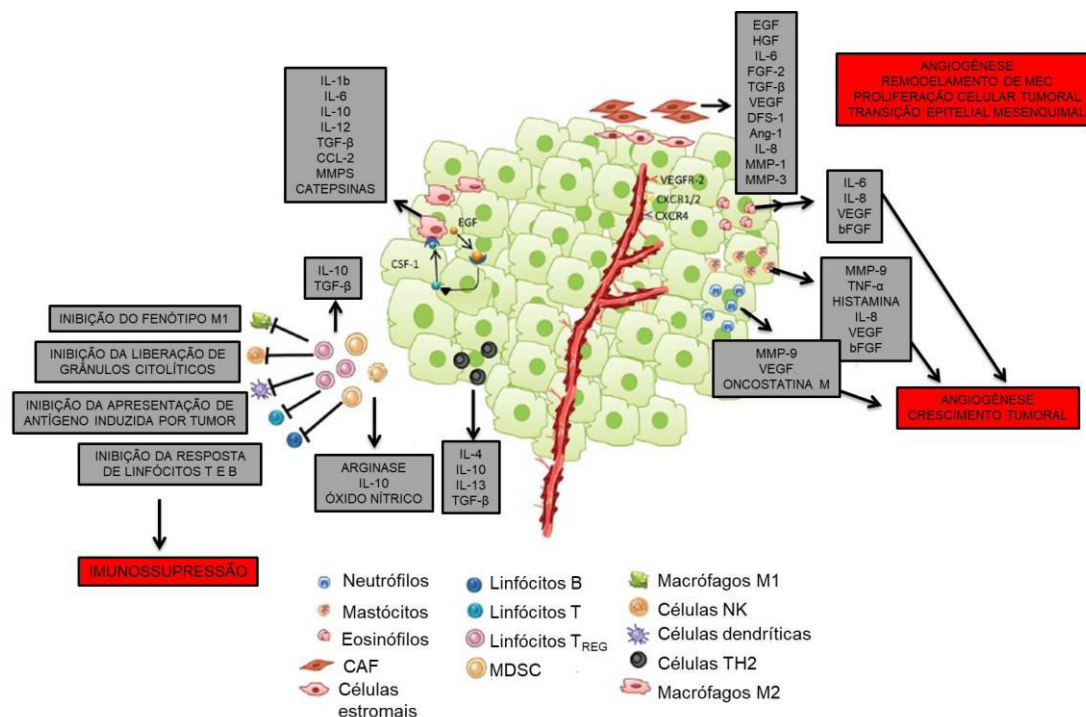
Vários marcadores como receptores de estrogênio e progesterona, HER2, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e ciclooxigenase 2 estão relacionados com o comportamento tumoral. (Horta et al., 2012).

## **2.2. Angiogênese tumoral**

O microambiente tumoral possui características desfavoráveis para a conservação celular como hipóxia, hipertensão e acidose extracelulares, resultantes da formação ineficaz de vasos no local, que promovem uma perfusão inadequada e heterogênea e dificultam o sucesso terapêutico (Vaupel, 2004; Carmeliet et al., 2011).

A angiogênese desregulada é provocada pela demanda de oxigênio e nutrientes pelas células tumorais. De início, estas conseguem se manter por difusão, porém neoplasias maiores que 2 mm<sup>3</sup> têm necessidade de irrigação sanguínea, fazendo com que haja liberação de fatores pró-angiogênicos no local. Com isso, tumores com crescimento rápido, considerados mais agressivos, geralmente apresentam necrose central. (Lewis, 1995; Gianni-Barreira et al., 2011).

Os fatores que promovem a formação de novos vasos sanguíneos em neoplasias são sintetizados pelas células tumorais juntamente com o estroma de sustentação e pelas células do sistema imune. Pode-se citar a liberação de fatores como IL-8, IL-10, TNF-  $\alpha$ , TGF- $\beta$ , metaloproteinases, FGF, VEGF, entre outros. Esses fatores não só estimulam a angiogênese, mas também modulam a resposta das células inflamatórias no local, auxiliando na evasão tumoral do sistema imune (Figura 1) (Stockmann et al., 2014; Ribatti, 2017).



**Figura 1.** Microambiente tumoral: sinergia entre células neoplásicas, estromais e inflamatórias (traduzido de Raffaghello et al., 2014). IL: interleucinas; TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral  $\beta$ ; CCL: quimiocina; MMP: metaloproteinases; EGF: fator de crescimento epidérmico; HGF: fator de crescimento de hepatócitos; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; DFS: Fator derivado de estroma; Ang: angiopoietina; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ .

As células inflamatórias tem papel importante na progressão tumoral, já que há inibição da apresentação de antígenos mediada por células dendríticas, linfócitos T e B, células NK e macrófagos do tipo M1, fenótipo no qual é bloqueado pela liberação de citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias (Hanahan e Weinberg, 2011). Alguns tumores podem ter até 50% de sua massa composta por infiltrado inflamatório, predominantemente composto por macrófagos do tipo M2 (Mantovani et al., 2002).

Os macrófagos vêm chamando a atenção por sua relação com prognósticos desfavoráveis em diversos tumores em humanos, como neoplasias de mama, próstata, pulmão e alguns linfomas (Lissbrant et al., 2000; Lee et al., 2002; Mantovani et al., 2002; Marinaccio et al., 2014). O infiltrado de macrófagos associados ao tumor (TAM), localizado principalmente em áreas de hipóxia, expressa VEGF e MMP-7, estimulando assim a migração e proliferação de células endoteliais (Nishizuka et al. 2001).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é considerado o principal fator envolvido na angiogênese e o mais estudado na oncologia. Sua função consiste em promover a migração e proliferação endotelial, além de aumentar a permeabilidade vascular e inibir a apoptose de células endoteliais (Gianni-Barreira et al., 2011). É alvo de vários protocolos de tratamento e suas vias de sinalização são focos de diversos trabalhos para melhor entendimento da fisiologia tumoral, principalmente se tratando de como essa molécula afeta no crescimento e evolução das neoplasias (Elaimy e Mercurio, 2018; Wang et al., 2018).

Já é bem estabelecido que, em tumores malignos, a expressão de VEGF é aumentada, resultando na formação de vasos tortuosos e incompletos, sendo considerados mais agressivos e com pior prognóstico (Milanta et al., 2010; Zhang et al., 2015). Entretanto, Gianni-Barreira et al. (2011) citam que a importância maior desse fator não é somente sua concentração, mas sua distribuição no local e sua influência no microambiente.

### **2.3. Alfa-b cristalina**

Alfa-b cristalina (CRYAB) é um membro da família de proteínas de choque térmico e está relacionada com diversos tipos de tumores em humanos. É uma chaperona que inibe a caspase-3 e, desse modo, inibe também a apoptose, além de estar envolvida na arquitetura celular e na proteção da célula contra estímulos estressores, como radiação, estresse oxidativo e hipóxia. Essa molécula, primariamente intracelular, também foi associada à inibição da liberação de citocromo C mitocondrial e previne a agregação de proteínas desnaturadas após exposição ao estresse, como desmina e vimentina (Quinlan, 2002; den Engelsman, 2013; Nagaraj et al., 2016).

Vários trabalhos descrevem a associação entre esta proteína com cardiomiopatias, miopatias e doenças degenerativas do sistema nervoso,

como Parkinson e Alzheimer (Iwaki et al., 1992; Shinohara et al., 1993; Selcen e Engel, 2003; Maloyan et al., 2005). Nagaraj et al. (2016) mostram que, além do potencial uso terapêutico da CRYAB nestas doenças, tendo como característica a redução de sua expressão, o aumento desta pode ser prejudicial ao organismo, como na fibrose pulmonar, em tumores e outras doenças relacionadas a angiogênese (Quinlan, 2002; Arrigo et al., 2012).

Diversos pesquisadores têm encontrado resultados semelhantes em tumores de origem distinta, consistindo no aumento da expressão de CRYAB em neoplasias malignas e na inibição de metástases após silenciamento gênico (Moyano et al., 2006; Boslooper et al., 2008; Holcakova et al., 2008). Malin et al. (2014) analisaram a expressão de CRYAB em tumores de mama de mulheres e concluiu tal fato, assim como van de Schootbrugge et al. (2014) em carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço. Ambos os trabalhos consideraram que esse aumento da expressão de CRYAB está relacionado com desenvolvimento de metástases.

A alfa-b cristalina também tem papel na angiogênese, atuando na modulação do VEGF. Essa molécula protege o VEGF da degradação intracelular e provoca um aumento na secreção deste fator, contribuindo para o desenvolvimento de novos vasos (Nahomi et al., 2013). Além disso, no meio extracelular, tem papel anti-inflamatório, inibindo IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e óxido nítrico e aumentando a concentração de IL-10 e MMP-8 no local (Masilamoni, 2005).

A CRYAB tem sido alvo de pesquisa para elaboração de novos protocolos terapêuticos na oncologia visando inibir sua expressão, entretanto supõe-se que sua inibição direta tenha efeito cardiotoxico. Alternativas como bloqueio da interação de CRYAB e outras moléculas têm-se mostrado promissoras, porém mais estudos são necessários para elucidar o comportamento dessa proteína (Fosu-Mensah et al., 2018)

### 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 e as Diretrizes de Prática da Eutanásia recomendada pelo CONCEA/MCTI, após apreciação e aprovação pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – Protocolo 27/2018). Todos os procedimentos foram realizados após a assinatura do Termo de Ciência e Autorização e/ou do Termo de Autorização para Coleta de Material Biológico pelos tutores dos cães.

Foram selecionados animais portadores de tumor de mama atendidos no Hospital Veterinário (HOV) da UFV entre abril e outubro de 2018 e coletadas informações das fichas clínicas. Os dados coletados consistem em idade, raça, peso, administração de anticoncepcionais e se houve castração e gestações prévias. Quanto ao tumor, as informações relacionadas à localização, dimensões, acometimento de linfonodos e detecção de metástases distantes (baseado no sistema TNM de estadiamento clínico descrito por Sorenmo et al., 2013) foram coletadas.

Exames ultrassonográficos simples e modo Doppler foram realizados no setor de Diagnóstico por Imagem do HOV/UFV imediatamente antes das mastectomias com o equipamento Mylab 30, Esaote® e transdutor microconvexo multifrequencial (5,0 a 8,0MHz), com o ajuste da frequência realizado de acordo com o tamanho do animal.

Em modo bidimensional (B), a ultrassonografia abdominal total foi realizada para procura de metástases e as massas localizadas nas glândulas mamárias foram avaliadas primeiramente para definição de ecogenicidade. Em seguida, a avaliação dos nódulos em modo Doppler foi realizada para análise de sua vascularização e mensuração de velocidades média, máxima (sistólica) e mínima (diastólica) do fluxo,

assim como de índices de resistividade ( $IR = \text{velocidade do pico sistólico} / \text{velocidade diastólica final} / \text{velocidade do pico sistólico}$ ) e pulsatilidade ( $IP = \text{velocidade de pico sistólico} - \text{velocidade diastólica final} / \text{velocidade média}$ ).

As mastectomias foram realizadas conforme as normas e rotina do HOV, sem interferência da pesquisa. Após o procedimento cirúrgico, fragmentos representativos dos nódulos foram fixados em solução de formalina a 10% tamponada, por 24 horas, e processados rotineiramente por meio de inclusão em parafina. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espessura, corados por hematoxilina e eosina e avaliados a microscopia óptica de luz. A classificação histológica dos tumores foi determinada de acordo com Goldschmidt et al. (2011), conforme a tabela 2.

A imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Veterinária da UFV somente em nódulos que apresentaram fluxo no exame ultrassonográfico em modo Doppler. Como controle, glândulas mamárias normais retiradas em necropsias de cadelas sem histórico de neoplasias foram utilizadas. Cortes de hemangioma e coração de cão foram utilizados como controles positivos para VEGF e CRYAB, respectivamente. A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 a 95<sup>o</sup> C por 10 minutos (VEGF) e dois ciclos de 5 minutos (CRYAB). Após 30 minutos de resfriamento, as lâminas foram imersas três vezes em água destilada por dois minutos. Depois, foi utilizado o bloqueador de peroxidase (EasyLink One – EasyPath<sup>®</sup>) por 10 minutos, os cortes foram lavados com água destilada e incubados com o bloqueador de proteína (EasyLink One – EasyPath<sup>®</sup>) por mais dez minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-VEGF (diluição 1:100, NB100-664, Novus Biologicals) e anti-CRYAB (diluição 1:250, F-10, Santa Cruz Biotechnology) foram incubados por uma hora a 37<sup>o</sup> C e lavados três vezes com PBS durante dois minutos cada. Os cortes foram incubados com o polímero EasyLink One (EasyPath<sup>®</sup>) 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 a avaliação foi feita de acordo com a intensidade da marcação e quantidade de células marcadas.

Para a análise estatística, a comparação entre os dados dos animais, do tumor e da análise histológica foi realizada com o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, conforme o caso. A comparação das variáveis ultrassonográficas, do tumor e da avaliação microscópica foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, teste t de Student, Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney, caso não apresentem normalidade ou homogeneidade de variâncias. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### **4. RESULTADOS**

Foram coletados dados de 31 cadelas atendidas no HOV/DVT – UFV com idades entre 4 e 17 anos. Destes, 4,2% (1/31) dos cães foram diagnosticados com metástases distantes no momento do atendimento, sendo que todos tinham mais que 13 anos ( $p < 0,001$ ). Em relação ao estadiamento clínico, a maioria dos cães foi classificada em estágios iniciais (I a III), enquanto que 4,2% dos animais estão no estágio V ( $p = 0,009$ ). O estágio IV não foi computado por falta da avaliação microscópica dos linfonodos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Distribuição percentual da presença de metástase e do estadiamento clínico segundo faixa etária.

<b>Idade</b>	<b>≤ 7 anos</b>	<b>8 a 12 anos</b>	<b>≥ 13 anos</b>	<b>*p</b>
<b>Metástase</b>				<b>&lt; 0,001</b>
Ausente	23,9	55,2	16,7	
Presente	0,000	0,000	4,2	
<b>Estágio</b>				<b>0,009</b>
I	3,1	10,4	4,2	
II	9,4	22,9	6,3	
III	11,5	21,9	6,3	
IV	0	0	0	
V	0	0	4,2	

\* valor de p ao teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

A maioria dos animais de pequeno porte foi classificada como estágio I, os de médio porte como estágio III e os de grande porte como estágio II, enquanto que somente 4,2% dos cães no estágio V eram de grande porte ( $p < 0,001$ ). Cadelas castradas, em sua maioria, foram classificadas como estágio III, enquanto aquelas não castradas como estágio II ( $p < 0,001$ ). Entretanto, animais com metástases distantes, classificadas assim como estágio V, passaram anteriormente por ovariectomia (OSH), de acordo com o histórico ( $p = 0,03$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição percentual do porte do animal, castração e uso de anticoncepcional segundo estadiamento clínico.

<b>Estágio</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>V</b>	<b>*p</b>
<b>Porte</b>					<b>&lt; 0,001</b>
Pequeno	14,6	12,5	7,3	0	
Médio	0	5,2	16,7	0	
Grande	3,1	20,8	15,6	4,2	
<b>Castração</b>					<b>&lt; 0,001</b>
Sim	5,2	11,5	3,1	4,2	
Não	12,5	27,0	36,5	0	
<b>Anticoncepcional</b>					<b>0,011</b>
Sim	0	7,3	14,6	0	
Não	17,7	31,2	25	4,2	
<b>Gestação</b>					<b>&lt; 0,001</b>
0	11,6	21,9	18,8	4,2	
1	4,2	0	12,5	0	
2	0	11,6	8,3	0	
3	2,1	0	0	0	
8	0	5,2	0	0	

\* valor de p ao teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

A administração de anticoncepcionais ( $p = 0,011$ ) e o número de gestações ( $p < 0,001$ ) também foram estatisticamente relevantes em relação ao estadiamento, sendo que animais classificados como estágio V não receberam nenhum tipo de contraceptivo ou foi gestante até o momento do diagnóstico.

De 98 tumores avaliados clinicamente, 74 foram retirados por nodulectomia ou mastectomia. Neste trabalho, 79,7% (59/74) dos tumores foram diagnosticados como neoplasia maligna, 18,9% (14/74) hiperplasia mamária e 1,4% (1/74) como neoplasia benigna. Considerando os critérios para graduação histológica, o pleomorfismo celular moderado é mais frequente nos animais de 8 a 12 anos ( $p = 0,02$ ) e em cadelas

nulíparas, enquanto animais com uma ou mais gestações têm pleomorfismo moderado a acentuado ( $p < 0,001$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Distribuição percentual da faixa etária e do número de gestações segundo pleomorfismo celular.

<b>Pleomorfismo</b>	<b>Discreto</b>	<b>Moderado</b>	<b>Acentuado</b>	<b>*p</b>
<b>Faixa Etária</b>				0,02
< 8 anos	0	5	0	
8 a 12 anos	5	31,7	13,3	
> 13 anos	20	18,3	6,7	
<b>Gestação</b>				0,039
0	0	40,7	16,9	
1	0	5,1	8,5	
2	5,1	1,7	13,5	
3	0	3,3	0	
8	0	0	5,1	

\* valor de p ao teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

Observou-se que cães de grande porte têm tumores mais sólidos, ou seja, com menos formação tubular, em comparação com animais de pequeno e médio porte ( $p = 0,017$ ). Neoplasias com formação tubular entre 10-75% foram mais frequentes em cadelas nulíparas ( $p = 0,039$ ) e em animais que não receberam contraceptivos ( $p = 0,025$ ). Nestes cães, o número de mitoses foi menor em relação àqueles que receberam anticoncepcionais ( $p = 0,003$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Distribuição percentual do porte do animal, uso de anticoncepcional e do número de gestações segundo formação tubular.

<b>Formação tubular</b>	<b>&gt; 75%</b>	<b>10 a 75%</b>	<b>&lt; 10%</b>	<b>p</b>
<b>Porte</b>				<b>*0,017</b>
Pequeno	3,3	26,7	8,3	
Médio	6,7	30	1,7	
Grande	0	11,7	11,7	
<b>Anticoncepcional</b>				<b>**0,025</b>
Sim	5,1	8,5	6,8	
Não	3,4	61	15,3	
<b>Gestação</b>				<b>*0,039</b>
0	1,7	45,8	10,2	
1	1,7	10,2	1,7	
2	5,1	5,1	10,2	
3	0	3,4	0	
8	0	5	0	

\* valor de p ao teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

\*\*valor de p ao teste exato de Fisher considerando nível de significância de 5%.

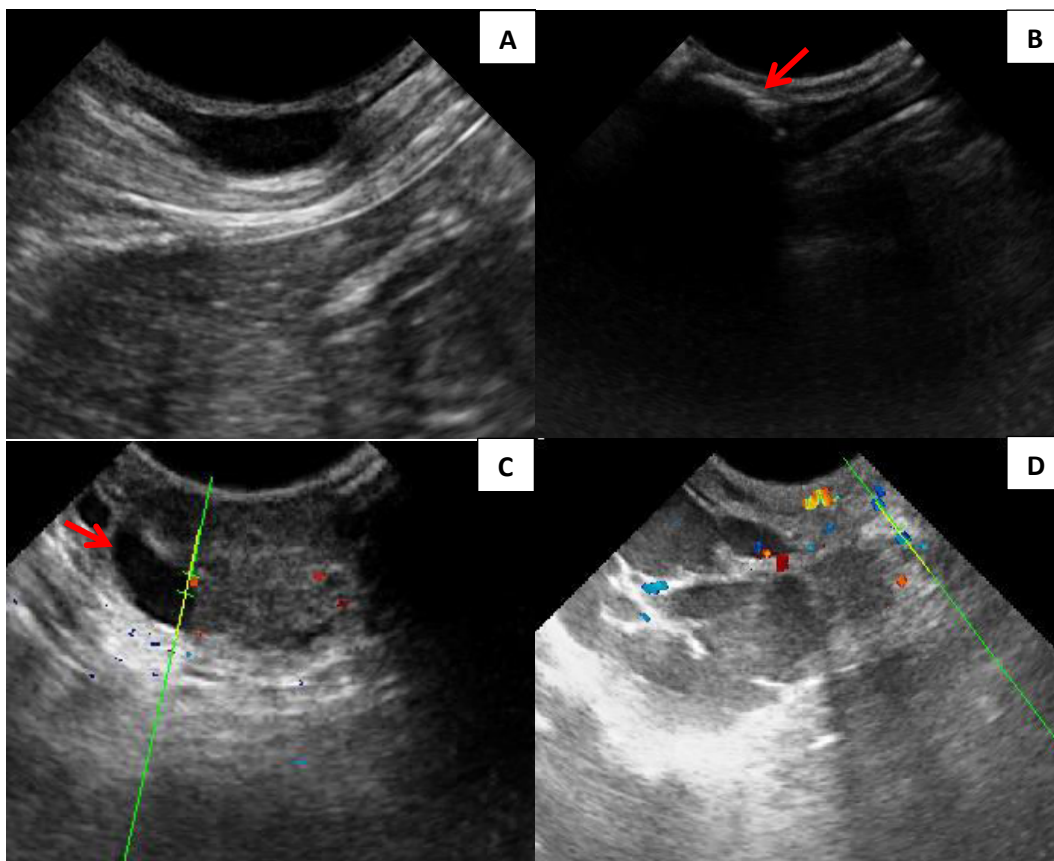
À ultrassonografia, os nódulos com ecogenicidade heterogênea foram, em sua maioria, diagnosticados como tumores malignos ( $p < 0,001$ ), com dimensões maiores que 3 centímetros ( $p = 0,006$ ) e classificados como estágio II e III ( $p = 0,034$ ) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Distribuição percentual da característica de malignidade dos nódulos, tamanho do tumor e estadiamento clínico segundo a ecogenicidade.

<b>Ecogenicidade</b>	<b>Homogênea</b>	<b>Heterogênea</b>	<b>p</b>
<b>Malignidade</b>			<b>**&lt;0,001</b>
Maligno	12,8	72,3	
Benigno	12,8	2,1	
<b>Tamanho do tumor</b>			<b>*0,006</b>
T1	19,6	19,6	
T2	1,7	33,9	
T3	7,1	17,8	
<b>Estágio</b>			<b>*0,034</b>
I	8,9	7,1	
II	5,4	39,3	
III	14,3	21,4	
V	0	3,6	

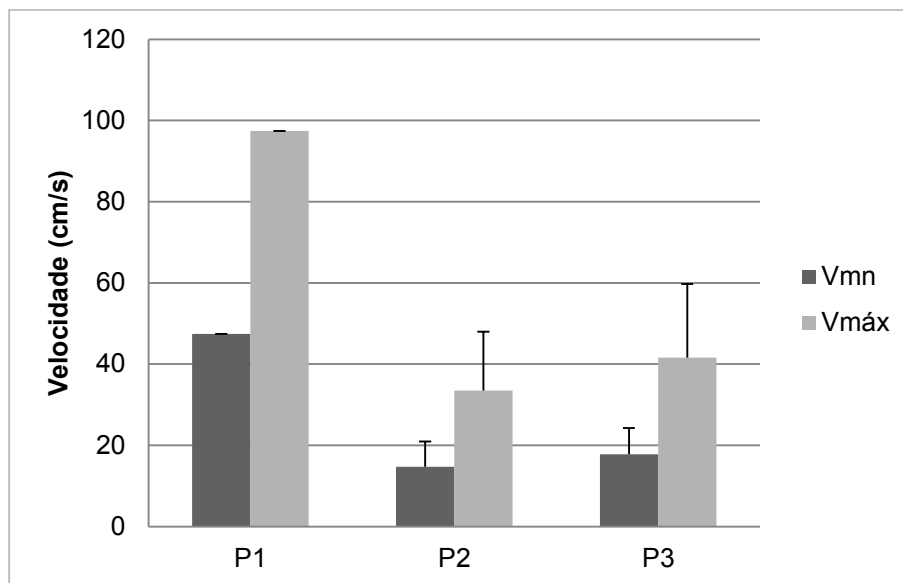
\* valor de p ao teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

\*\*valor de p ao teste exato de Fisher considerando nível de significância de 5%.

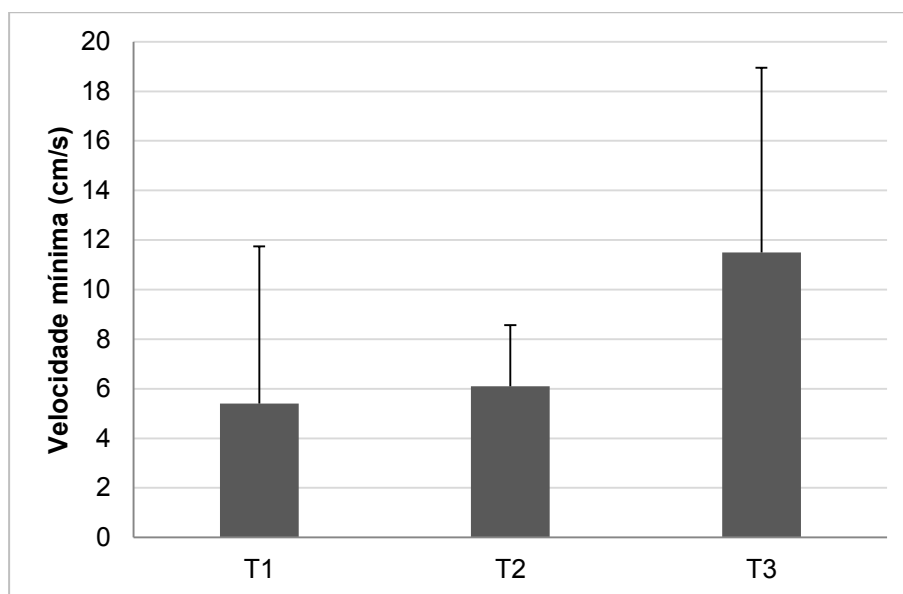


**Figura 2.** Imagens ultrassonográficas de neoplasias mamárias caninas. **A.** Nódulo com ecogenicidade homogênea em modo B. **B.** Nódulo com área hiperecogênica (seta) formadora de sombra acústica em modo B. **C.** Nódulo com ecogenicidade heterogênea e área anecóica sugestiva de área cística (seta) em modo Doppler. **D.** Nódulo com ecogenicidade heterogênea em modo Doppler.

O fluxo sanguíneo foi detectado em 40,8% (40/98) dos nódulos. As neoplasias que possuíam pleomorfismo discreto apresentaram maior velocidade média do fluxo em relação aos pleomorfismo moderados e acentuados ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os dois últimos. Em relação à velocidade mínima e as dimensões dos nódulos, houve diferença significativa entre T2 e T3 ( $p = 0,01$ ), sendo que tumores com mais de 5 centímetros tem maior velocidade. A velocidade máxima também apresentou diferença significativa entre pleomorfismo discreto e os demais, possuindo uma média de 97,4 cm/s ( $p < 0,001$ ) (Figuras 2 e 3). Com relação aos índices de resistividade e pulsatilidade, nenhuma correlação foi estatisticamente relevante quanto aos parâmetros citados anteriormente.



**Figura 3.** Representação gráfica das médias das velocidades média (Vmn) e máxima (Vmáx) em relação ao pleomorfismo celular, ( $p < 0,001$ ).



**Figura 4.** Representação gráfica das médias da velocidade mínima em relação ao tamanho do tumor na classificação TNM, ( $p = 0,010$ ).

A imuno-histoquímica com os anticorpos anti-VEGF e anti-CRYAB foi realizada nos 40 nódulos que obtiveram medidas de fluxo na ultrassonografia, além das glândulas mamárias normais. Comparativamente, os tumores tiveram expressão de ambas as proteínas aumentada em relação ao tecido mamário normal, definida por uma maior área do corte e maior intensidade da marcação. Observou-se uma relação

direta entre a marcação de VEGF e CRYAB, tanto na quantidade de células quanto na intensidade. Além da positividade das células neoplásicas propriamente ditas, também foi avaliada a marcação de macrófagos infiltrados no tumor (Tabela 9).

**Tabela 9.** Distribuição percentual da quantidade de células marcadas por CRYAB e sua intensidade de cor e marcação de macrófagos por VEGF segundo a quantidade de células tumorais marcadas por VEGF.

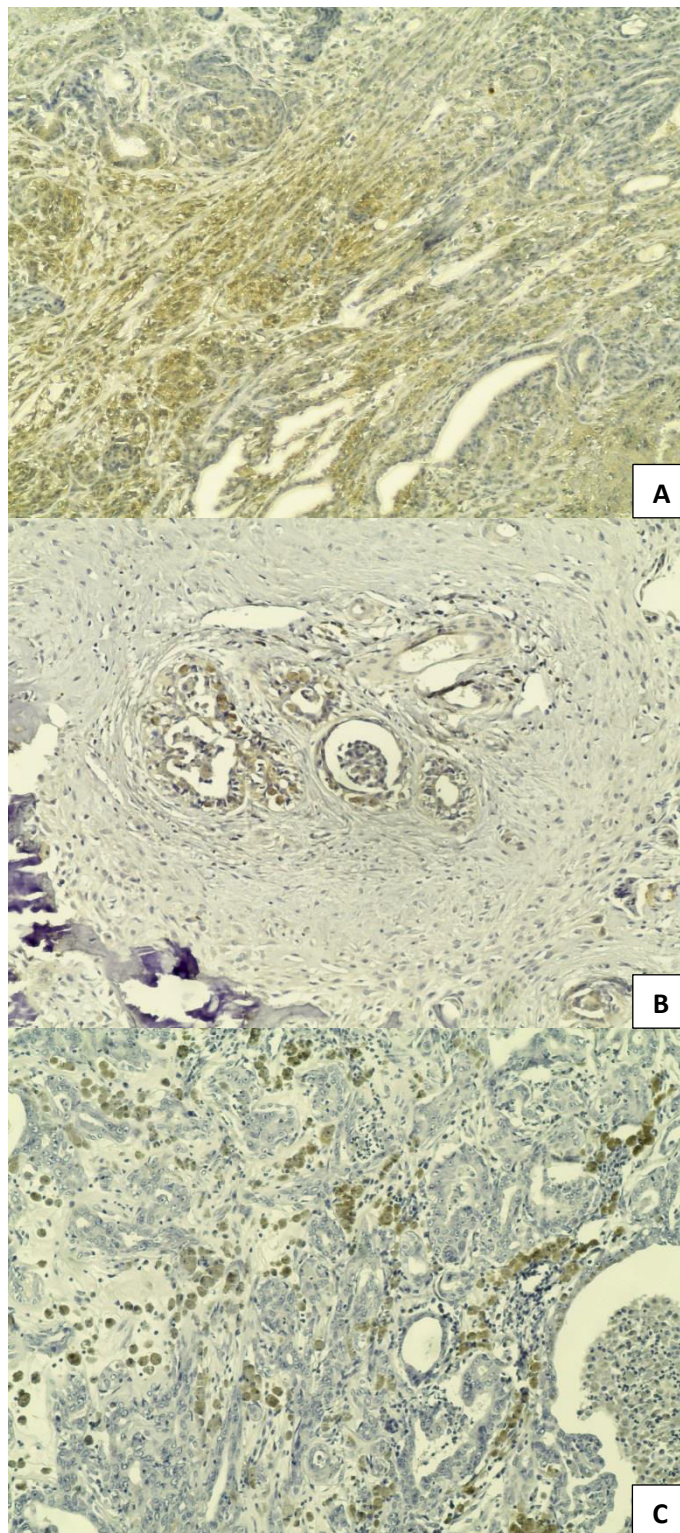
<b>VEGF</b>	<b>Ausente</b>	<b>Discreto</b>	<b>Moderado</b>	<b>*p</b>
<b>Quantidade</b>				
<i>qCRYAB</i>				<0,01
Ausente	23,1	2,6	0	
Discreto	17,9	20,5	5,1	
Moderado	2,6	10,3	17,9	
<i>mVEGF</i>				0,028
Ausente	28,2	7,7	12,8	
Discreto	12,8	7,7	2,6	
Moderado	0	17,9	5,1	
Acentuado	2,6	0	2,6	
<b>Intensidade</b>				
<i>iCRYAB</i>				0,011
Ausente	23,1	2,6	0	
Discreto	5,1	0	0	
Moderado	7,7	28,2	5,1	
Acentuado	7,7	17,9	2,6	

\* valor de p ao teste de qui-quadrado considerando nível de significância de 5%.

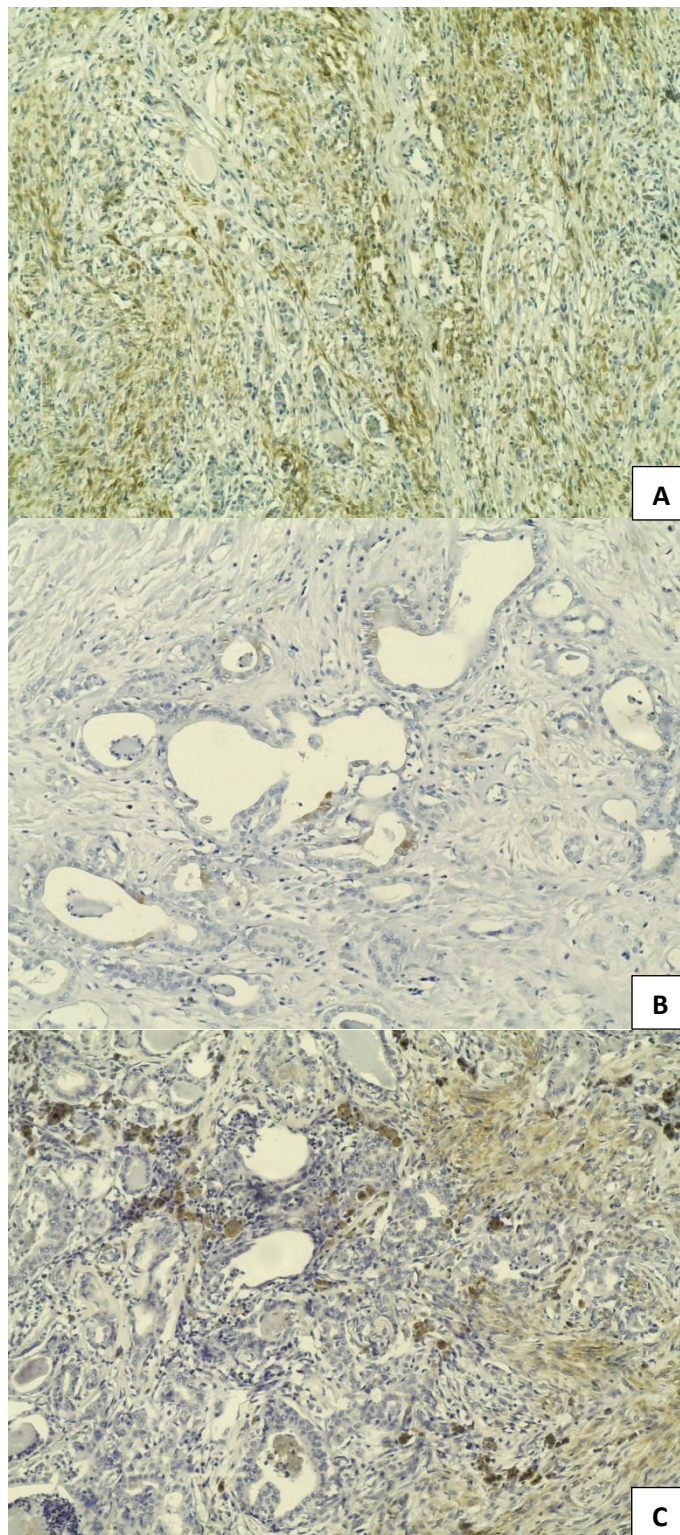
*qCRYAB*: quantidade de células tumorais marcadas para CRYAB

*iCRYAB*: intensidade da marcação para CRYAB

*mVEGF*: quantidade de macrófagos marcados para VEGF



**Figura 5.** Imunodeteção do antígeno citoplasmático VEGF em neoplasias mamárias caninas. **A.** Quantidade e intensidade moderadas (Obj 20X). **B.** Quantidade e intensidade discretas (Obj 20x) **C.** Marcação de macrófagos (Obj 20x).

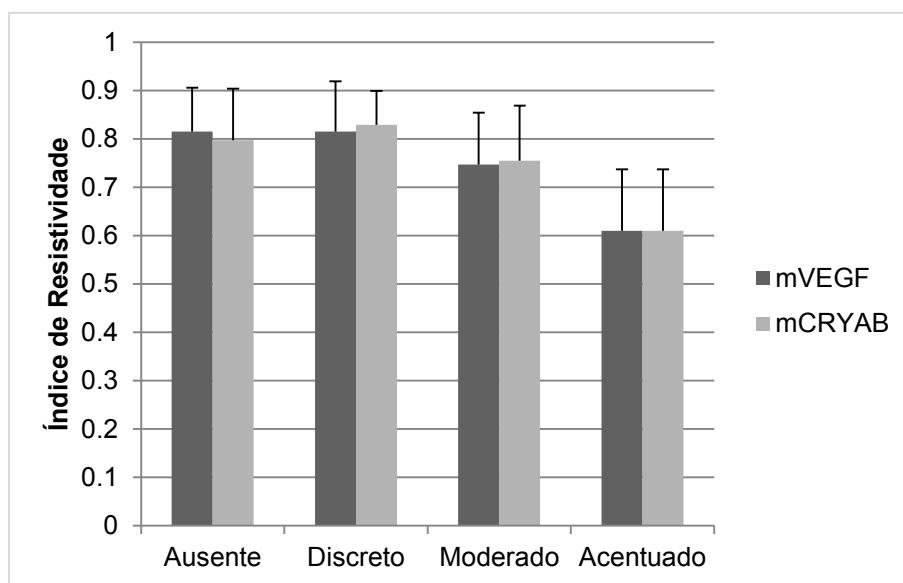


**Figura 6.** Imunodeteção do antígeno citoplasmático CRYAB em neoplasias mamárias caninas. **A.** Quantidade e intensidade acentuadas (Obj 20X). **B.** Quantidade e intensidade discretas (Obj 20x) **C.** Marcação de macrófagos (Obj 20x).

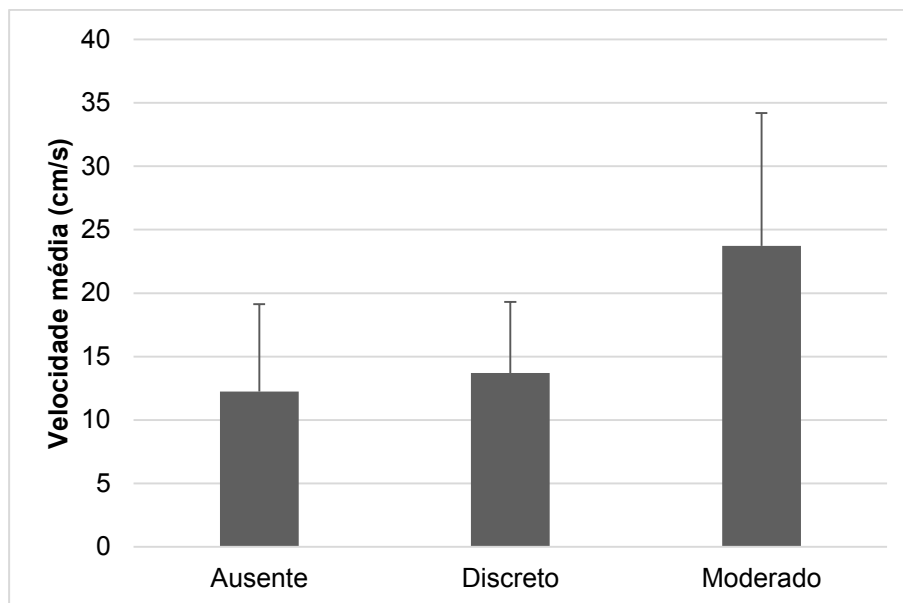
Com relação às características dos animais, aqueles que tiveram marcação moderada de macrófagos para VEGF são, em geral, mais

velhos, com animais maiores de 13 anos com marcação acentuada dessas células ( $p = 0,08$ ). A castração também influenciou a intensidade da marcação de CRYAB das células tumorais, sendo que a maioria dos animais não castrados apresentou intensidade de cor moderada a acentuada ( $p = 0,02$ ).

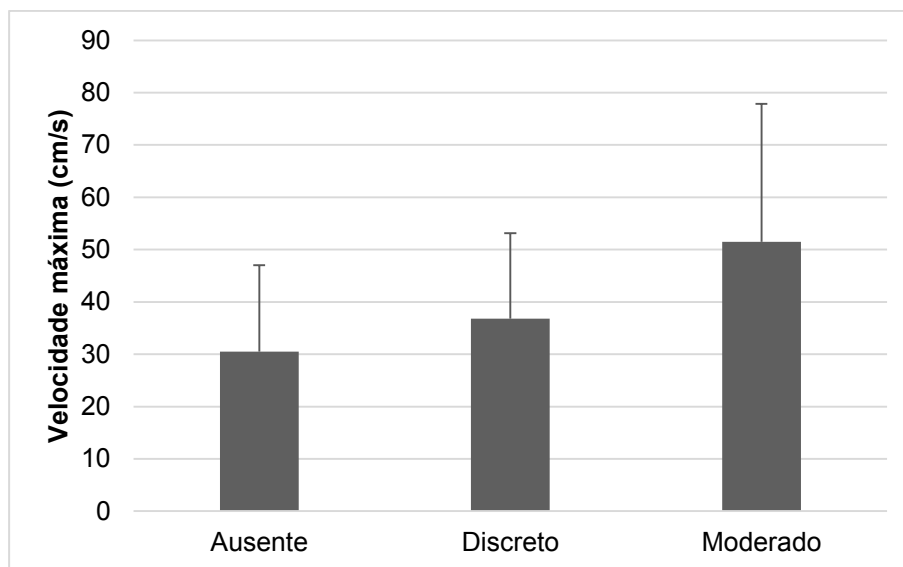
A relação entre as variáveis ultrassonográficas do modo Doppler e a imunohistoquímica estão demonstradas nos gráficos abaixo. As demais correlações não foram estatisticamente relevantes.



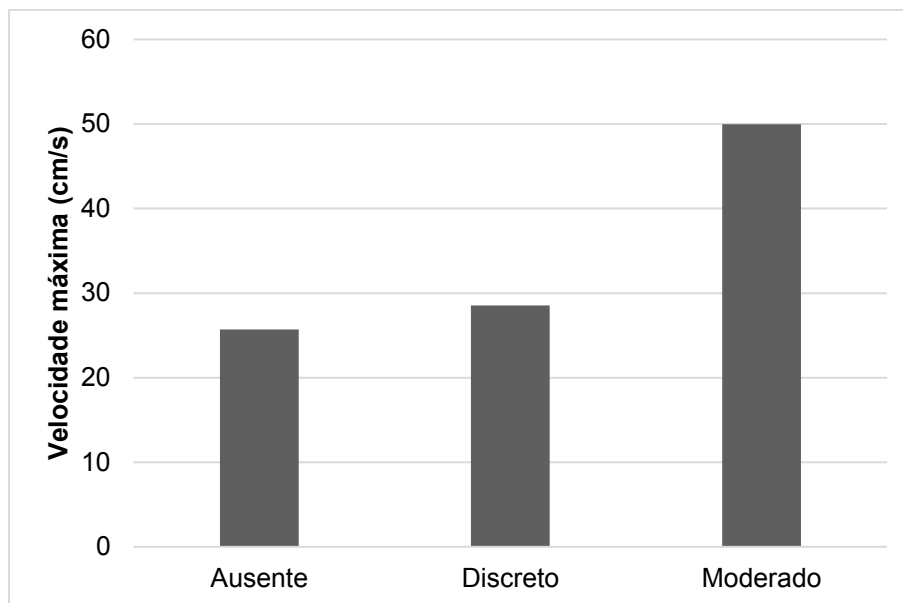
**Figura 7.** Representação gráfica das médias de índice de resistividade em relação à quantidade de macrófagos marcados por VEGF (mVEGF ;  $p = 0,029$ ) e CRYAB (mCRYAB;  $p = 0,048$ ).



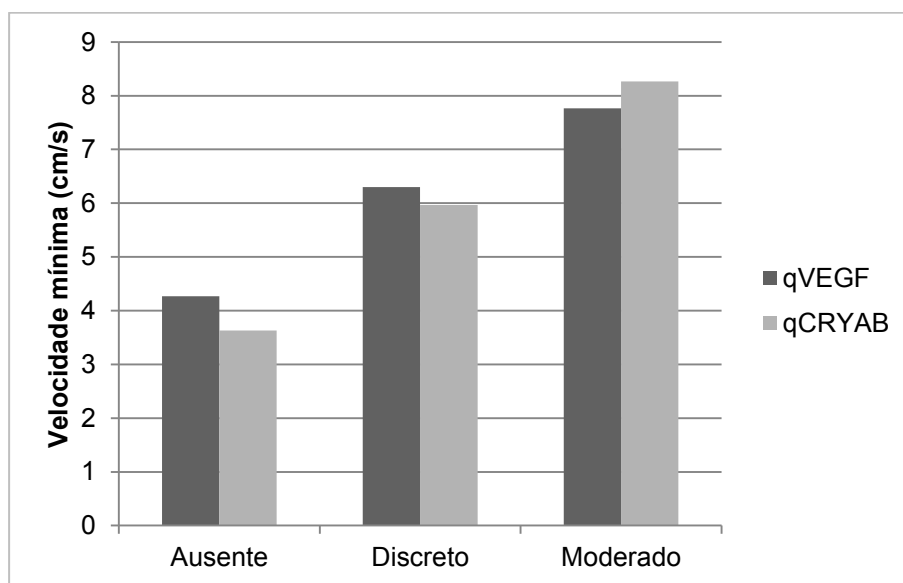
**Figura 8.** Representação gráfica das médias de velocidade média em relação à quantidade de células marcadas por CRYAB ( $p = 0,001$ ).



**Figura 9.** Representação gráfica das médias de velocidade máxima em relação à quantidade de células marcadas por VEGF ( $p = 0,039$ ).



**Figura 10.** Representação gráfica das medianas de velocidade máxima em relação à quantidade de células marcadas por CRYAB ( $p = 0,005$ ).



**Figura 11.** Representação gráfica das medianas de velocidade mínima em relação à quantidade de células marcadas por VEGF (qVEGF;  $p = 0,032$ ) e CRYAB (qCRYAB;  $p = 0,034$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foram analisadas as associações de diversas características clínicas, ultrassonográficas, histológicas e imunohistoquímica de tumores mamários caninos, buscando parâmetros

que possam auxiliar o médico veterinário na avaliação do paciente. Foi observado que a alfa-b cristalina está diretamente relacionada com a castração e características ultrassonográficas dos nódulos, como o índice de resistividade e as velocidades máxima, média e mínima, além de sua relação com a expressão do VEGF, comprovando a ligação da CRYAB com a angiogênese.

Já é bem estabelecido que a idade é um fator de risco, sendo que animais entre 7 e 13 anos são mais acometidos, como descrito por Schneider (1970) e Goldschmidt et al. (2001). Neste trabalho, a faixa etária foi mais ampla, de 4 a 17 anos, demonstrando que o aparecimento de nódulos mamários na espécie canina acompanha o aumento da expectativa de vida desses animais.

Animais mais velhos também tem maior chance de apresentar metástases distantes no momento do atendimento e as quantidades moderada e acentuada de macrófagos marcados para VEGF em relação aos animais mais novos corrobora com a literatura. Tal fato pode ser explicado pelo aumento de secreção de fatores de crescimento, interleucinas e metaloproteinases por células senis que induzem a migração e invasão tecidual e das células neoplásicas (Davalos et al., 2010).

Em relação aos cães mais novos, o diagnóstico clínico de tumor mamário está provavelmente associado ao histórico reprodutivo do animal, já que os animais com menos de 7 anos não eram castrados no momento do atendimento, apesar de não terem recebido nenhuma aplicação de anticoncepcional. Sabe-se que a OSH antes do terceiro estro diminui o risco para o desenvolvimento da neoplasia devido à perda da influência de hormônios sobre as glândulas mamárias (Schneider et al., 1970).

A castração teve influência significativa neste trabalho em relação ao estadiamento, porém indo em direção contrária. Provavelmente os animais estudados foram submetidos à cirurgia depois do terceiro cio, perdendo assim seu efeito protetor. Apesar disso, em alguns animais a

OSH é recomendada depois da mastectomia na tentativa de evitar recidivas e metástases de neoplasias responsivas a hormônios (Cassali, 2017). Na maioria dos cães não castrados, a expressão de CRYAB foi classificada como moderada a acentuada em relação a intensidade da cor, sugerindo uma associação entre as duas variáveis. Todavia, mais estudos são necessários para definir qual a relação entre a alfa-b cristalina e hormônios sexuais.

Seguindo o mesmo raciocínio, animais que receberam anticoncepcionais têm maior estímulo hormonal para o desenvolvimento de neoplasias mamárias. Misdorp (1991) relata que a aplicação de baixas doses de progestágeno pode causar o desenvolvimento de tumores benignos enquanto sua associação com estrógeno pode induzir o aparecimento de tumores malignos. A falta de informação do tipo de contraceptivo utilizado nos animais deste trabalho impossibilita fazer essa relação, entretanto todos os animais que receberam anticoncepcionais foram diagnosticados com tumores malignos, com maior número de mitoses em relação aos que não receberam.

Neste experimento, houve um maior número de atendimentos de cães de pequeno porte, em sua maioria classificados como estágio I. Esses animais têm maior atenção dos proprietários, que os levam para atendimento veterinário com mais frequência e mais precocemente, portanto o tamanho do nódulo e evolução do tumor ainda são discretos. Assim, cadelas com porte médio e grande (na maioria estágios III e II, respectivamente) têm nódulos de dimensões maiores, sendo que cães de grande porte têm tumores mais sólidos. Esta é uma tendência observada na clínica e apontada também por Goldschmidt et al. (2017).

No que se refere ao pleomorfismo, uma das características avaliadas para se determinar a graduação histológica do tumor e prever seu comportamento, cadelas com uma ou mais gestações apresentaram pleomorfismo moderado a acentuado, enquanto nos animais nulíparos, a diferença no formato das células foi considerada moderada. A gestação, segundo Brodey et al. (1966), não tem influência significativa no

desenvolvimento de neoplasias mamárias. A maioria dos animais acompanhados não foi gestante até o momento do atendimento e, dentre aqueles com uma ou mais gestações, grande parte recebeu anticoncepcional, o que traz de volta o argumento de sua aplicação. Esses dados conferem com o relato de Russo e Russo (1980) no qual descreve que a gestação pode proteger a glândula mamária em relação a tumores.

Neste trabalho, a ecogenicidade heterogênea dos nódulos está relacionada ao diagnóstico de neoplasia maligna, do mesmo modo que as dimensões e o estadiamento clínico, entretanto lesões benignas também podem apresentar tal característica. Há grande controvérsia na literatura sobre a avaliação da ecogenicidade de tumores, enquanto Nyman et al. (2006) dizem que um nódulo heterogêneo sugere um tumor maligno, Lana et al. (2007) mostram que regiões com ecogenicidade maior podem representar áreas de tecido ósseo e/ou cartilaginoso, comuns em tumores mistos. Áreas anecoicas e com sombreamento acústico, sugestivas de áreas císticas e mineralização respectivamente, também foram observadas neste trabalho, estando a última relacionada a um tumor maligno.

Na ultrassonografia no modo Doppler, o índice de resistividade não apresentou diferenças significativas entre as variáveis, exceto em relação à quantidade de macrófagos marcados tanto por VEGF quanto por CRYAB. O infiltrado granulomatoso acentuado faz com que a taxa metabólica do tumor seja mais alta, logo o IR tem valores mais baixos em relação à ausência dessas células, indo de acordo com Carvalho (2009) que apresenta que este índice tem um valor mais baixo em tecidos com metabolismo alto.

A velocidade máxima do fluxo mensurada foi maior nos tumores com pleomorfismo discreto enquanto a velocidade mínima foi maior naqueles com pleomorfismo acentuado. Ambas foram maiores nos tumores que expressam moderadas quantidades de VEGF e CRYAB, propondo uma relação positiva entre a fisiologia dessas neoplasias e o

aumento da velocidade de fluxo nesses locais, associados ao maior metabolismo e à formação de novos vasos. Dock et al. (1991), assim como Feliciano et al. (2017) mostram que a velocidade sistólica maior que 20cm/s é sugestiva de tumores malignos, o que foi constatado neste trabalho. Todavia, nódulos diagnosticados como hiperplasia mamária também apresentaram valores acima de 20 cm/s, indicando que deve-se associar a outros achados na tentativa de predizer o diagnóstico por este método.

A relação entre a expressão de VEGF e CRYAB demonstrada nesse trabalho vai de encontro com a literatura, associando essas duas moléculas a manutenção e evolução tumoral em humanos, atuando principalmente na formação de novos vasos. Porém, a importância da alfa-b cristalina na medicina veterinária ainda necessita ser mais bem estudada, além da interação dessas duas proteínas e a progressão tumoral.

## **6. CONCLUSÃO**

Conclui-se que a alfa-b cristalina tem sua expressão aumentada em neoplasias mamárias caninas e que sua interação com o fator de crescimento endotelial vascular contribui para a angiogênese tumoral. Achados clínicos e ultrassonográficos, como a castração, o índice de resistividade e velocidades máxima e mínima do fluxo sanguíneo também estão relacionados com a CRYAB, porém mais estudos são necessários para elucidar como essas informações podem ser utilizadas na rotina clínica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRIGO, A.P.; SIMON, S.; GIBERT, B.; et al. Hsp27 (HspB1) and  $\alpha$ B-crystallin (HspB5) as therapeutic targets. **FEBS Lett**, 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. **Vet Pathol**, 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. Teton New Media, Jackson, 2002**, p. 565-572.
- BOSLOOPER, K.; KING-YIN LAM, A.; GAO, J.; et al. 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. **J Am Vet Med Assoc**, v.149, p.1406–15, 1966.
- CAMPOS, L.C.; LAVALLE, G.E.; ESTRELA-LIMA, A.; et al. CA15.3, CEA and LDH in dogs with malignant mammary tumors. **J Vet Intern Med** v.26, p.1383-1388, 2012.
- CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**. v.473, 2011.
- CĂRTÂNĂ, E.T.; GHEONEA, D.I.; CHERCIU, I.F.; et al. Assessing tumor angiogenesis in colorectal cancer by quantitative contrast-enhanced endoscopic ultrasound and molecular and immunohistochemical analysis. **Endosc 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.
- DAVALOS, A.R.; COPPE, J.P.; CAMPISI, J.; DESPREZ, P.Y. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, v.29, p.273-283, 2010.

DEN ENGELSMAN, J.; VAN DE SCHOOTBRUGGE, C.; YONG, J.; et al. Pseudophosphorylated alphaB-crystallin is a nuclear chaperone imported into the nucleus with help of the SMN complex. **PLoS One**. (9): e73489. 2013.

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

ELAIMY, A.; MERCURIO, A.M. Convergence of VEGF and YAP/TAZ signaling: Implications for angiogenesis and cancer biology. **Sci. Signal**. v.11, eaau1165, 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, e0178143, 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. **J Small Anim Pract** v.53, p.332–337, 2012.

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

FOSU-MENSAH, N.A.; JIANG, W.; BRANCALE, A.; et al. The Discovery of purine-based agentes targeting triple-negative breast cancer and the  $\alpha$ B-crystallin/VEGF protein-protein interaction. **Med Chem Res**, 2018.

GIANNI-BARRERA, R.; TRANI, M.; REGINATO, S.; BANFI, A. To sprout or to split? VEGF, Notch and vascular morphogenesis. **Biochem Soc Trans**, v.39, p.1644-1648, 2011.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S.; AND SMELSTOYS, J.A. Neoplastic lesions of the mammary gland In: U. Mohr, W.W. Carlton, D.L. Dungworth, et al. **Pathobiology of the Aging Dog Iowa State University Press, Ames, IA, 2001** p.168–178.

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

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

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

HOLCAKOVA, J.; HERNYCHOVA, L.; BOUCHAL, P.; et al. Identification of  $\alpha$ B-crystallin, a biomarker of renal cell carcinoma by SELDI-TOF MS. **Int J Biol Mark**, 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.; et al. Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathologic conditions. **Am J Pathol.** v.140, n.2, p.345-356. 1992.

KESHAVARZ, E.; MEHRJARDI, M.Z.; KARIMI, M.A.; et al. Diagnostic Value of Spectral Doppler Ultrasound in Detecting Breast Malignancies: An Original Article. **Int J Cancer Manag.** In Press(In Press):e8200, 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.; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. **Nat Med**, v.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. **J Leukoc Biol**, v.57, p. 747-751,1995.

LISSBRANT, I.F.; STATTIN, P.; WIKSTROM, P.; et al. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. **Int J Oncol** v.17, p.445–451, 2000.

- MALIN, D.; STREKALOVA, E.; PETROVIC, V.; et al. AlphaB-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain. **Clin Cancer Res.** v. 20, p.56–67. 2014.
- MALOYAN, A.; SANBE, A.; OSINSKA, H.; et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in  $\alpha$ -B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. **Circulation.** v. 112, n. 22, p.3451-3461. 2005.
- MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol** v.23, p.549–555, 2002.
- MARINACCIO, C.; INGRAVALLO, G.; GAUDIO, F.; et al. Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk Res** v.38, 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, p.411-20, 2005.
- MILANTA F, CANESCHI V, RESSEL L. Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-inflammatory mammary carcinoma. **J Comp Pathol**, v.142, p.36–42, 2010.
- MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals. 4 ed. Ames, Blackwell, 2002**, p. 575-606.
- MISDORP, W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. **Acta Endocrinol**, v.125, p27–31, 1991.
- MOE, L. Population-based incidence of mammary tumors in some dog breeds. **J Reprod Fertil Suppl** v.57, p.439-443, 2001.
- NAGARAJ, R. H.; NAHOMI, R.B.; MUELLER, N.H.; et al. Therapeutic potential of  $\alpha$ -crystallin. **Biochim Biophys Acta** v.1860, p.252–257, 2016.
- NAHOMI, R.B.; WANG, B.; RAGHAVAN, C.T.; VOSS, O.; DOSEFF, A.I.; SANTHOSHKUMAR, P.; NAGARAJ, R.H. Chaperone peptides of alpha-crystallin inhibit epithelial cell apoptosis, protein insolubilization, and opacification in experimental cataracts. **J Biol Chem.** v.288, p.13022–13035. 2013.

- NISHIZUKA, I.; ICHIKAWA, Y.; ICHIKAWA, T.; et al. Matrylisin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. **Cancer Lett** v.173, p.175–182, 2001.
- NYMAN, H.T.; NIELSEN, O.L.; MCEVOY, F.J.; et al. 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.
- 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.; et al. 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. **Vet Pathol**, v.50, p.94-105, 2013.
- QUINLAN R. Cytoesqueletal competence requires protein chaperones. **Mol Subcell Biol**. v.28, p219-233, 2002.
- RAFFAGHELLO, L.; VACCA, A.; PISTOIA, V.; RIBATTI, D. Cancer associated fibroblasts in hematological malignancies. **Oncotarget**, v. 6, n.5, p.2589- 2603, 2014.
- RIBATTI, D. **Inflammation and Angiogenesis**, Springer, 2017. 111p.
- RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Susceptibility of the Mammary Gland to Carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, P.497-512, 1980.
- SCHNEIDER, R. Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast câncer. **Cancer**, v.26,p.419-426, 1970.
- SELCEN, D.; ENGEL, A.G. Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. **Ann Neurol**, v.54, n.6, p.804-810. 2003.
- SHINOHARA, H.; INAGUMA, Y.; GOTO, S.; et al. Alpha B-crystallin and HSP28 are enhanced in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. **J Neurol Sci**. v.119, n.2, p.203-208. 1993.

SORENMO KU., DEANNA RW., GOLDSMIDT RH. 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.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The impact of the immune system on tumor: angiogenesis and vascular remodelin. **Frontiers in Oncology**, 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. **Hum Pathol.** v.40, n.3, p.300-305. 2009.

VAN DE SCHOOTBRUGGE, C.; SCHULTS, E.M.J.; BUSSINK, J.; et al. Effect of hypoxia on the expression of  $\alpha$ 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 câncer. **Int J Clin Exp Med;** v.11, p.13763-13768, 2018.

WERNER, P.R.; WERNER, J. Avaliação histopatológica. In: DALECK CR 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. **J Gastrointest Oncol.** v.10, p.307–313, 2015.