

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR) EM NEOPLASIAS MAMÁRIAS CANINAS

Caio Livonesi Dias de Moraes¹; Priscila Pavini Cintra²; Sabryna Gouveia Calazans³;
Cristiane dos Santos Honsho³; Geórgia Modé Magalhães³.

1- Graduando- Universidade de Franca- UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

2-Mestranda do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos
Animais, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

3- Profa. Dra. do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos
Animais, Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca-SP, Brasil

Email : georgiamode@hotmail.com

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

RESUMO

As neoplasias mamárias caninas, além de serem um excelente modelo experimental para estudo de neoplasias mamárias humanas, é uma doença clinicamente muito importante na medicina veterinária. Não somente em neoplasias malignas, a angiogênese contribui para a fase pré-maligna microscópica de progressão neoplásica, caracterizando um papel importante e marcante no câncer. O objetivo desse estudo foi avaliar a intensidade de imunomarcção de VEGF nos diferentes graus de malignidade de neoplasias mamárias caninas. Foram analisadas 103 amostras de neoplasias mamárias caninas do setor de Patologia Veterinária da Universidade de Franca. A técnica imuno-histoquímica empregada foi o sistema de detecção livre de biotina (REVEAL). A imunomarcção para o anticorpo VEGF foi citoplasmática e as neoplasias mamárias foram divididas em 28 amostras grau I, 37 grau II e 38 grau III. Na análise estatística em relação à intensidade de imunomarcção grau I foi significativamente maior em relação ao grau II e grau III ($p < 0,01$) e não houve diferença estatística entre grau II e III. Esses resultados corroboram com autores que encontraram menor quantidade de grânulos de VEGF nos maiores graus de malignidade. Outro estudo relacionou a quantidade de VEGF com tamanho tumoral, e características microscópicas como crescimento, necrose, infiltração linfóide, metástase em linfonodo, grau histopatológico, e índice de proliferação celular sendo o VEGF expresso tanto em tumores benignos quanto nos malignos sem relação com esses fatores. Conclui-se que a intensidade de imunomarcção para VEGF foi maior nas neoplasias mamárias caninas de baixo grau de malignidade.

PALAVRAS-CHAVE:angiogênese,cães, imuno-histoquímica, neoplasias mamárias.

EVALUATION OF THE INTENSITY OF IMMUNOSTAINING OF VEGF IN CANINE MAMMARY NEOPLASIAS

ABSTRACT

Canine mammary neoplasms as well as being an excellent experimental model to study human breast tumors, is a clinically important disease in veterinary medicine. Not only in malignancies, angiogenesis contributes to the microscopic premalignant stage of neoplastic progression featuring a striking and important role in cancer. The

aim of this study was to evaluate the intensity of immunostaining of VEGF in different degrees of malignancy of canine mammary neoplasms. There were used 103 samples of canine mammary neoplasms of Laboratory of Veterinary Pathology, of Franca University. Immunohistochemical technique was the detection system of free biotin (REVEAL). The immunostaining for VEGF antibody was cytoplasmic and canine mammary tumors were divided into 28 samples grade I, 37 grade II and 38 grade III. Statistical analysis regarding the intensity of immunostaining grade I was significantly higher compared to grade II and grade III ($p \leq 0,01$) and there was no statistical difference between grade II and III. These results corroborate with authors that found a smaller amount of granules of VEGF in greater degrees of malignancy. Another study linked the amount of VEGF in tumor size, and microscopic characteristics such as growth, necrosis, lymphocytic infiltration, lymph node metastasis, histological grade, cell proliferation and with the express VEGF in both benign and malignant tumors as unrelated to these factors. We conclude that immunostaining for VEGF was higher in canine mammary tumors of low malignancy. **KEYWORDS:** angiogenesis, dogs, immunohistochemistry, mammary neoplasms.

INTRODUÇÃO

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) normalmente relacionado com aumento da angiogênese estimulados em tecidos com acentuada hipóxia tem sido associado com a indução da angiogênese tumoral. Na neoplasia, as células da periferia podem expressar altos níveis de angiogênese e não estarem em hipóxia (NEUFELD et al., 1999). Como em tecidos normais tumores requerem oxigênio para manutenção que provem de neovascularização. Durante a progressão tumoral uma mudança na angiogênese é ativada transformando a vasculatura que apresentava-se em repouso em brotamentos de vasos que ajudam a sustentar a expansão de crescimentos neoplásicos. Não somente em neoplasias malignas, a angiogênese contribui para a fase pré-maligna microscópica de progressão neoplásica caracterizando um papel importante e marcante no câncer (HANAHAN & FOLKMAN 1996).

Atualmente em neoplasias humanas muitas terapias anti-angiogênicas têm sido propostas com bons resultados quando adjuvantes a quimioterápicos. Algumas também ainda necessitam de mais estudos para serem recomendadas (FAKHREJAHANI & TOI, 2014; VASUDEV & REYNOLDS, 2014)

Tumores de mama são os mais frequentes em cadelas e estima-se que mais de 50% sejam malignos (DE NARDI et al., 2009; OLIVEIRA-FILHO, et al., 2010; SHAFIE, et al., 2013). Além de ser um excelente modelo experimental para estudo de neoplasia mamária humana (MUNSON & MORESCO, 2007), a neoplasia mamária canina é uma doença clinicamente muito importante na medicina veterinária. O tratamento de neoplasias mamárias caninas é baseado na retirada cirúrgica e avaliação histopatológica levando em consideração o tipo e o grau tumoral. Em tumores agressivos, quimioterapias, radioterapias ou imunoterapias não previnem recidivas (MACÉWEN, 1990).

Existem poucos estudos com terapias anti-angiogênicas em cães, e ainda em neoplasias mamárias é pouco instituído. Com isso, objetivou-se nesse estudo avaliar a intensidade de imunomarcção de VEGF em neoplasias mamárias caninas e relacionar com o grau de malignidade tumoral.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de Franca com o número de protocolo 037/13. Foram reavaliadas 103 amostras de neoplasias mamárias caninas do setor de Patologia Veterinária da Universidade de Franca e classificadas de acordo com CASSALI et al. (2014).

A técnica imuno-histoquímica empregada foi o sistema de detecção livre de biotina (REVEAL). Os cortes de tecido com 4 μ foram desparafinizados, reidratados e, então, foi realizada a recuperação antigênica com solução tampão TRIS/EDTA pH 9, em panela de pressão elétrica (ELITE PLATIUM) por 40 minutos. Em seguida, após resfriar por 20 minutos foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos com a aplicação do Bloqueador de Peroxidase (reagente do kit Reveal Spring). Após essa etapa, os cortes foram lavados por cinco minutos em Tampão de Lavagem TBS com Tween 20. A seguir, os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução bloqueadora de reação inespecífica (Reagente do kit Reveal Spring – Cod SPD-125) por 10 minutos. Ato contínuo, os cortes foram incubados em câmara úmida com o anticorpo primário VEGF, policlonal, clone VG1 na diluição 1:500, marca Abcam, e então incubados a 4°C por 18 horas. Após o período de *overnight*, os cortes foram novamente lavados em PBS, procedendo-se então a incubação com o polímero ligado a peroxidase, (Polímero Reveal HRP, kit Spring- cod SPD-125) perfazendo um total de 25 minutos. As lâminas foram novamente lavadas, e a reação revelada pelo substrato cromogênicodiaminobenzidina (DAB líquido, reagente do kit Reveal Spring – Cód. SPD -125).

A seguir, a reação foi interrompida com a lavagem em água destilada, seguidas de contra-coloração com Hematoxilina de Harris (1-2 minutos). Os cortes passaram pela bateria crescente de álcool e por xilol, foram montados com Permount (Fisher Scientific) e observados em microscopia de luz.

Como controle positivo da reação foram utilizadas lâminas de hemangiossarcoma caninos e como controle negativo, substituiu-se o anticorpo primário por diluente de anticorpo (BSA 5%) em todas as reações imuno-histoquímicas.

Os dados foram analisados de acordo com a intensidade de marcação com o programa ImagePro-Plus versão 4.5.0.29 for Windows EUA. Para cada amostra foram obtidas as médias de cinco campos que foram fotomicrografados e analisados no programa. A análise computacional fornecia um valor em porcentagem da intensidade de imunomarcção. Os resultados foram analisados pelos testes não paramétricos ANOVA e seguidos por Kruskal Wallis.

RESULTADOS

Foi realizado uma análise semi-qualitativa da imunomarcção do anticorpo VEGF, que mostrou-se uma marcação citoplasmática (Figura 1 e 2), sendo confirmada tanto no controle positivo (hemangiossarcoma) como em células endoteliais presentes na neoplasia (controle positivo interno). Foram analisadas 103 amostras de neoplasias mamárias de cadelas, divididas em 28 amostras de grau I, 37 de grau II e 38 de grau III, conforme o quadro 1. A média de imunomarcção para o grau I foi de 0,9, a média para o grau II e III foi de 0,3. Na análise estatística em relação à intensidade de imunomarcção o grau I foi significativamente diferente em relação ao grau II e grau III ($p \leq 0,01$) e não houve diferença estatística entre grau II e III, conforme figura 3.

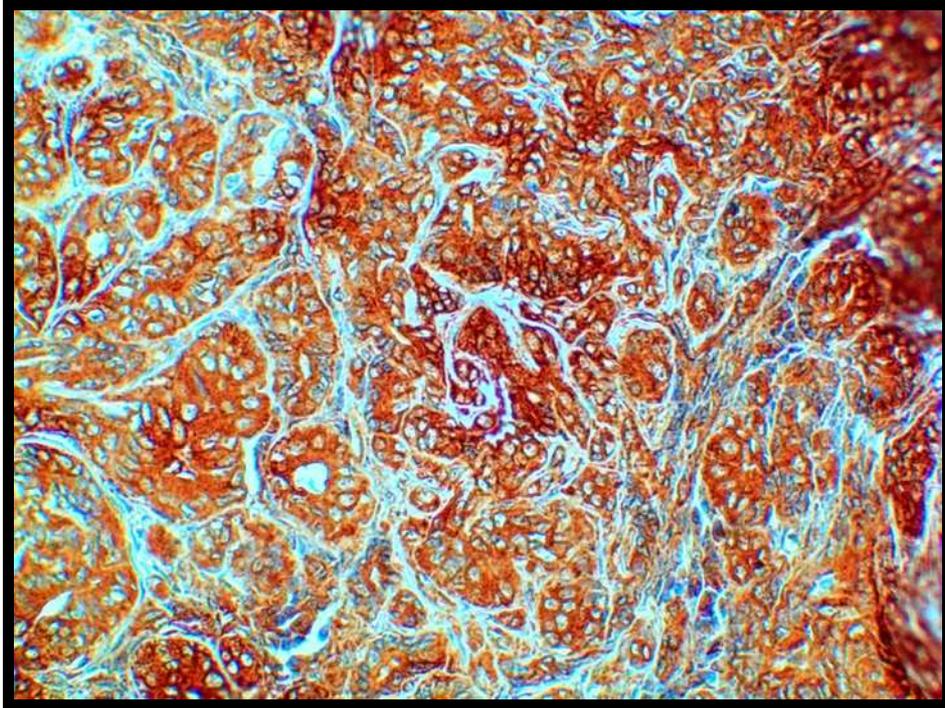


FIGURA 1: Fotomicrografia de carcinoma mamário padrão tubular grau I em cadela. Reação de imuno-histoquímica, livre de biotina sistema REVEAL, cromógeno DAB. Obj.40x. Notar marcações citoplasmáticas em forte intensidade.

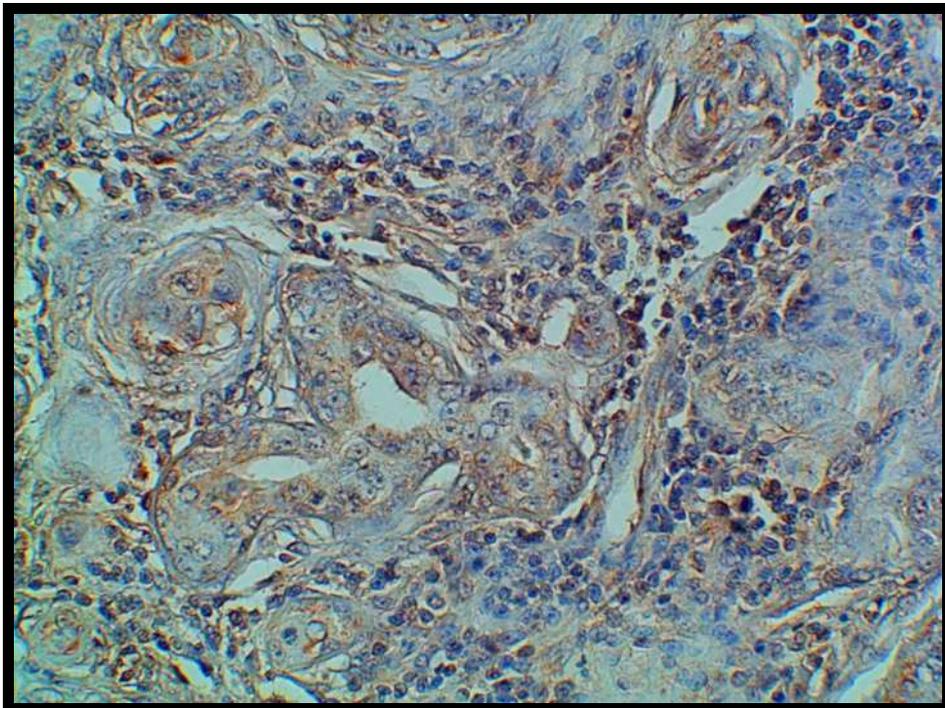


FIGURA 2: Fotomicrografia de carcinoma mamário padrão sólido grau II em cadela. Reação de imuno-histoquímica, livre de biotina sistema REVEAL, cromógeno DAB. Obj.40x. Notar marcações citoplasmáticas em fraca intensidade.

QUADRO 1: Identificação dos tipos histopatológicos de neoplasias mamárias caninas imunomarcadas pelo VEGF.

| Neoplasia | Número de amostras |
|-----------------------------------|--------------------|
| Carcinoma tubular grau I | 9 |
| Carcinoma tubular grau II | 9 |
| Carcinoma tubular grau III | 9 |
| Carcinoma papilar grau I | 9 |
| Carcinoma papilar grau II | 10 |
| Carcinoma papilar grau III | 10 |
| Carcinoma sólido II | 9 |
| Carcinoma sólido III | 9 |
| Carcinoma em Tumor Misto grau I | 10 |
| Carcinoma em Tumor Misto grau II | 9 |
| Carcinoma em Tumor Misto grau III | 10 |
| Total | 103 |

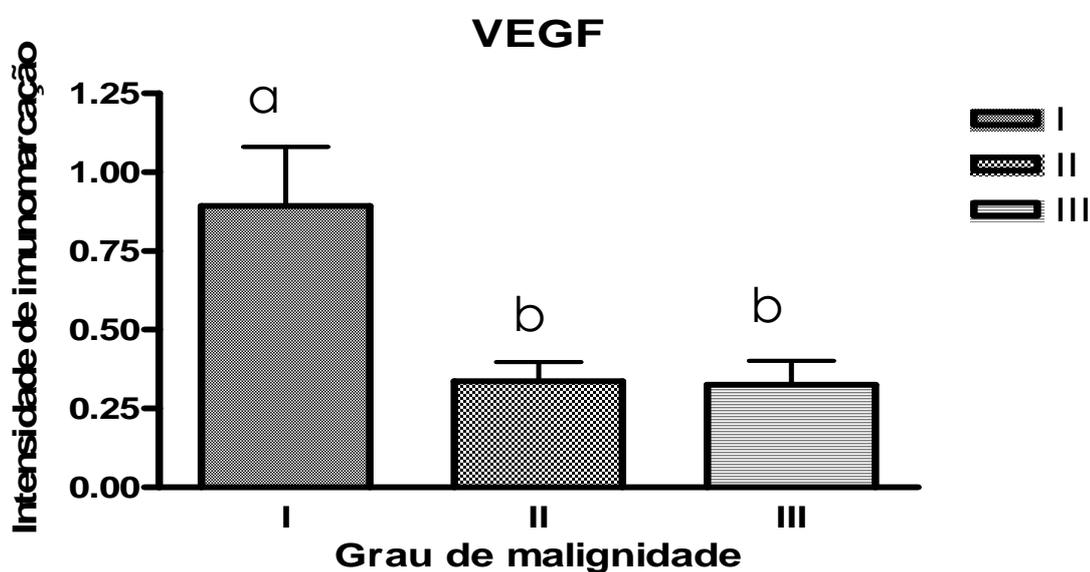


FIGURA 2: Intensidade de imunomarcagem de VEGF nos diferentes graus de malignidade em neoplasias mamárias caninas

DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi realizar uma análise semi-qualitativa da intensidade de imunomarcagem, sendo os tumores grau I com mais intensidade que

as neoplasias grau II e grau III. Esses resultados corroboram com autores que encontraram menor quantidade de grânulos de VEGF nos maiores graus de malignidade (RESTUCCI et al., 2002). A perda dos grânulos e conseqüentemente a diminuição da intensidade de imunomarcção pode estar relacionada com a indiferenciação celular. A imunomarcção citoplasmática do VEGF também foi observada por outros autores, porém em relação à intensidade de imunomarcção esses autores não obtiveram diferença estatística entre tumores benignos e malignos (STRAGLIOTTO et al., 2013).

De acordo com a classificação utilizada CASSALI et al. (2014), o grau de malignidade tumoral é caracterizado por pleomorfismo celular, quantidade de formações tubulares e número de figuras de mitoses. Provavelmente não houve diferenças significativas entre grau II e grau III devido ao grau II já estar desenvolvendo acentuada anaplasia celular.

Diferente deste estudo, SANTOS et al. (2010) fizeram uma análise semi-quantitativa que relacionou a quantidade de imunomarcção de VEGF com o tamanho tumoral, e características microscópicas como crescimento, necrose, infiltração linfóide, metástase em linfonodo, grau histológico, e índice de proliferação celular sendo o VEGF expresso tanto em tumores benignos quanto nos malignos não havendo relação com esses fatores. A quantidade de VEGF também não se relacionou com o tempo de sobrevivida e tempo livre da doença em pacientes caninas com neoplasias mamárias (SANTOS et al., 2013). Avaliações de quantidade de VEGF também foram detectadas em maiores quantidades em neoplasias malignas do que nas benignas (FELICIANO et al., 2012).

CONCLUSÃO

Com relação a intensidade de imunomarcção, observou-se maior quantidade em neoplasias mamárias grau I do que em grau II e grau III. Sendo provável que a indiferenciação celular diminua a intensidade de imunomarcção.

REFERÊNCIAS

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAUJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; DI SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B.F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. F. V.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Patology**, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S.; FERNANDES, S. C. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C.R; DE NARDI, A.B; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 26, p. 371-383.

FAKHREJAHANI, E.; TOI, M. Antiangiogenesis therapy for breast cancer: an update and perspectives from clinical trials. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v.44, n.3, p.197– 207, 2014.

FELICIANO, M. A. R.; SILVA, A. S.; PEIXOTO, R. V. R.; GALERA, P. D.; VICENTE, W. R. R. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p. 1094-1100, 2012.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, p. 353–364, 1996.

MAC EWEN, E. G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer and treatment. **Cancer Metastase Reviews**, v.9, p.125-36, 1990.

MUNSON, L.; MORESCO, A. Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. **Breast Disease**, v.28, p.7-21, 2007.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB Journal**, v.13, p.9-22, 1999.

OLIVEIRA-FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K.; MARQUES, B. M. F. P. P.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Estudo retrospectivo de 1647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v.39, p. 488-493, 2002.

SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, J. T.; LOPES, C. C.; AMORIM, I. F.; VICENTE, C. M.; GÄRTNER, F. R.; MATOS, A. J. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 4, p. 268-275, 2010.

SANTOS, A. A.; LOPES, C. C.; RIBEIRO, J. R.; MARTINS, L. R.; SANTOS, J. C.; AMORIM, I. F.; GÄRTNER, F. R.; MATOS, A. J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v.9, p.1-11, 2013.

SHAFIEE, R.; JAVANBAKHT, J.; ATYABI, N.; KHERADMAND, P.; KHERADMAND, D.; BAHRAMI, A.; DARAEI, H.; KHADIVAR, F. Diagnosis, classification and grading of canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: aclinico-cytopathological study with environmental factors influencing public health and medicine. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p. 79, 2013.

STRAGLIOTTO, A. M. I. V. et al. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular em tumores mamários de cadelas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, n.1096, p. 1-6, 2013.

VASUDEV, N. S.; REYNOLDS, A. R. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. **Angiogenesis**, v.17, p.471–494, 2014.