

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Jessika Daniel

**Avaliação imuno-histoquímica das expressões de LOX, LOXL2 e HIF1A em  
tumores mamários caninos**

---

Pirassununga

2023

Jessika Daniel

**Avaliação imuno-histoquímica das expressões de LOX, LOXL2 e HIF1A em tumores mamários caninos**

"versão corrigida"

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi

---

Pirassununga

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D184a Daniel, Jessika  
Avaliação imuno-histoquímica das expressões de  
LOX, LOXL2 e HIF1A em tumores mamários caninos /  
Jessika Daniel ; orientador Ricardo de Francisco  
Strefezzi. -- Pirassununga, 2023.  
64 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Câncer. 2. Glândula mamária. 3. Matriz  
extracelular. 4. Prognóstico. I. Strefezzi, Ricardo  
de Francisco, orient. II. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "COMPONENTES DO MICROAMBIENTE TUMORAL E SEU VALOR COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS EM NEOPLASIAS CANINAS", CEUA nº 7498190221 (ID 069966), sob a responsabilidade de Ricardo de Francisco Strefezzi e equipe; Bruna dos Santos; Paulo Edson Baptista Martinelli; Giovanna Pedroso Vicente; Bethânia Almeida Gouveia; Jessika Daniel Urel; Ingrid Kester Lima Silva; Fernanda Ramalho Ramos; Karina Cavaliheri Bittencourt - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) em 05/07/2021.

Certificamos que a seguinte proposta foi aprovada como SUBPROJETO à proposta principal citada acima:

- AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS EXPRESSÕES DE LOX, LOXL2 E HIF1-ALFA EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS, executada por Jessika Daniel Urel.

Término previsto: 01/2025

Origem: Hospital Veterinário UDCH

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

idade: 0 a 25 anos

Quantidade  
mantida: 0

Utilização: qualquer

Peso: 0 a 100 kg

### ANIMAIS UTILIZADOS

		Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Cães	Machos e Fêmeas	1000	0

Pirassununga, 12 de maio de 2023

Prof. Dr. Luciane Silva Martello  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Fabiana Fernandes Bressan  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

## ***Dedicatória***

*À Laura, minha maior fonte de motivação e alegria. Por toda compreensão  
com meus momentos de ausência.*

## ***Agradecimentos***

A Deus, pela vida, pelas dádivas recebidas e pela força demonstrada por meio de um pensamento iluminado nas horas de escuridão e desânimo, sou imensamente grata.

À minha família: Minha mãe, minha filha e meu companheiro de vida, vocês foram meu alicerce e meu porto seguro em todas as etapas desafiadoras dessa caminhada. Desde o início, vocês me encorajaram a seguir meus sonhos e nunca deixaram de acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava do meu próprio potencial.

Não posso deixar de mencionar os amigos que se tornaram minha segunda família: Natália, Ingrid, Thaís, Giovanna, Karina, Bruna, Tiago, Paulo e Bethânia vocês estiveram presentes em todos os momentos, apoiando-me e encorajando-me quando mais precisei.

Ao meu orientador, Professor Ricardo, sou imensamente grata por todos esses anos de convivência, por seus valiosos ensinamentos e pelas oportunidades que me proporcionou. Você me mostrou a importância da vida dedicada à pesquisa e às novas descobertas científicas. Agradeço de coração por acreditar e confiar em mim, por sua orientação constante e por me incentivar a alcançar o meu melhor.

À Prof. Valentina Zapulli e suas orientadas Lucrezia e Valentina Moccia, por toda a confiança e ensinamentos transmitidos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) –Processos FAPESP: 2020/12789-1 e 2021/14519-4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

DANIEL. J. **Avaliação imuno-histoquímica das expressões de LOX, LOXL2 e HIF1A em tumores mamários caninos.** 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2023.

Os tumores mamários constituem cerca de 50% das neoplasias em cadelas e mesmo os indicadores prognósticos convencionalmente aceitos, não conseguem prever adequadamente o comportamento clínico destes tumores. Esse fato destaca a necessidade de identificar marcadores prognósticos mais eficazes. As proteínas da família LOX desempenham um papel na progressão do câncer, associando-se à invasão tumoral, metástases e prognósticos desfavoráveis em vários tipos de tumores. HIF1A possui relação com a agressividade, progressão e resistência à terapia do câncer de mama e controla as vias de expressão das Lisil oxidases. Os objetivos dessa pesquisa foram caracterizar a expressão imuno-histoquímica das proteínas LOX, LOXL2 e HIF1A em amostras de neoplasias mamárias de cadelas com o intuito de avaliação prognóstica e investigar os efeitos da hipóxia nas expressões de LOX e HIF1A em linhagens celulares de carcinomas mamários humanos e caninos, bem como seu efeito na migração e proliferação celulares. Foram analisadas 95 amostras de carcinomas mamários de 91 cadelas com acompanhamento clínico mínimo de 180 dias. As amostras de tumores foram submetidas à imuno-histoquímica para detecção de LOX, LOXL2 e HIF1A. As reações foram quantificadas em cinco imagens à objetiva de 40x obtidas em campos aleatórios e em campos de alta marcação. Os resultados foram comparados aos tipos histológicos, mortalidade decorrente da doença e tempo de sobrevivência pós-cirúrgica. Para os testes *in vitro*, foram utilizadas uma linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231), uma canina (CIPp), e uma linhagem metastática de carcinoma sólido de cão (CIPm). A hipóxia foi simulada mediante a aplicação de dicloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) e glicose oxidase/catalase. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para LOX, LOXL2 e HIF1A entre os grupos histológicos de Alta e Baixa Malignidade, quando comparadas a presença/ausência de marcação em células epiteliais, a porcentagem de células epiteliais marcadas e a intensidade de marcação. Todos os casos analisados no grupo de animais censurados apresentaram marcação para a proteína LOXL2 em células epiteliais, enquanto 33,3% dos casos em que o óbito foi decorrente do tumor foram negativos. Apenas 12,5% dos tumores de Alta Malignidade apresentaram fibroblastos positivos para HIF1A, contra 61,4% dos de Baixa Malignidade ( $p=0,0180$ ). Nas primeiras 24 horas de hipóxia, apenas a linhagem CIPm não apresentou redução significativa da proliferação e 8 horas após o tratamento, a migração das células tratadas com  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  mostrou um aumento significativo na migração em comparação com o grupo controle. Nossos resultados sugerem que a menor expressão de HIF1A em fibroblastos intratumorais e menor expressão de LOXL2 são indicadores de maior chance de morte em decorrência de carcinomas mamários. A hipóxia induzida por  $\text{CoCl}_2$  desencadeia redução significativa na proliferação celular inicial e, sob condições hipóxicas, células de linhagens metastáticas aumentam sua atividade migratória.

**Palavras-chave:** Câncer, glândula mamária, Matriz extracelular, prognóstico

## ABSTRACT

DANIEL. J. **Immunohistochemical evaluation of LOX, LOXL2 and HIF1A expression in canine mammary tumors.** 2022. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Mammary tumors account for about 50% of neoplasms in female dogs, and even the conventionally accepted prognosis indicators cannot adequately predict the clinical behavior of these tumors. This fact highlights the need to identify more effective prognostic markers. The LOX family proteins play a role in cancer progression, associated with tumor invasion, metastasis, and unfavorable prognosis in various tumor types. HIF1A is related to aggressiveness, progression, and resistance to breast cancer therapy and controls the expression pathways of Lysyl oxidases. The objectives of this research were to characterize the immunohistochemical expression of the LOX, LOXL2, and HIF1A proteins in mammary neoplasms of bitches for prognostic evaluation, and to investigate the effects of hypoxia on the expressions of LOX and HIF1A in human and canine mammary carcinoma cell lines, as well as the effect of these proteins on cell migration and proliferation. Ninety-five samples of mammary carcinomas from 91 female dogs with a minimum clinical follow-up of 180 days were analyzed. Tumor samples were subjected to immunohistochemistry for the detection of LOX, LOXL2, and HIF1A. The reactions were quantified in five images using a 40x objective, obtained at random fields or *hot spots*. The results were compared with histological types, mortality due to the disease, and post-surgical survival time. For *in vitro* experiments, a human and a canine mammary adenocarcinoma cell lines (MDA-MB-231 and CIPp, respectively), and a metastatic cell line derived from a solid carcinoma from a dog (CIPm) were used. Hypoxia was simulated by applying cobalt dichloride (CoCl<sub>2</sub>) and glucose oxidase/catalase. No statistically significant differences were found for LOX, LOXL2, and HIF1A between the High and Low Malignancy histological groups when comparing the presence/absence of labeling in epithelial cells, the percentage of labeled epithelial cells, and the intensity of labeling. All censored cases in the survival analysis were positive for LOXL2 in epithelial cells, while 33.3% of the dogs that died due to the tumor were negative. Only 12.5% of High Malignancy tumors had positive fibroblasts for HIF1A, compared to 61.4% of Low Malignancy group (p=0.0180). In the first 24 hours of hypoxia, the CIPm lineage did not show significant reduction in proliferation and, 8 hours after treatment, cells treated with 100 µM of CoCl<sub>2</sub> showed a significant increase in migration compared with the control group. Our results suggest that lower HIF1A expression in intratumoral fibroblasts and lower LOXL2 expression are indicators of a higher chance of death due to mammary carcinomas. CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia triggers a significant reduction in cell proliferation and, under hypoxic conditions, CIPm cells increase their migratory activity.

**Keywords:** Cancer, extracellular matrix, mammary gland, prognosis



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>12</b>
2.1. ANATOMIA E FIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA	12
2.2. NEOPLASIAS MAMÁRIAS EM CÃES	12
2.2.1. DIAGNÓSTICO	13
2.2.2. GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA	16
2.2.3. TRATAMENTO	20
2.3. MICROAMBIENTE TUMORAL	21
2.4. LOX E LOXL2	23
2.5. HIF1A	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO	28
4.2. PROCESSAMENTO HISTOPATOLÓGICO	28
4.3. VALIDAÇÃO DO ANTICORPO WESTERN BLOTTING (WB)	28
4.4. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS LOX E HIF1A <i>IN VITRO</i>	31
4.4.1. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	31
4.4.2. ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR	32
4.4.3. QUANTIFICAÇÃO DE LOX E HIF1A EM CÉLULAS EXPOSTAS A CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E NORMÓXIA	33
4.5. PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO	35
4.6. QUANTIFICAÇÃO DAS REAÇÕES	37
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>38</b>
5.1. CASUÍSTICA	38
5.2. CULTIVO CELULAR	39
5.2.1. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	40
5.2.2. ENSAIOS DE MIGRAÇÃO CELULAR	43
5.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE LOX E HIF1A EM CÉLULAS EXPOSTAS A CONDIÇÕES DE HIPÓXIA E NORMÓXIA	45
5.3. VALIDAÇÃO DO ANTICORPO	47
5.4. IMUNO-HISTOQUÍMICA	47
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>59</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um processo biológico complexo e multifatorial, e a causa mais comum de morte entre os cães. A crescente incidência de processos neoplásicos na rotina clínica de animais de companhia, de maneira similar à população humana, se deve, dentre outros fatores, ao aumento da expectativa de vida dessas espécies (DE NARDI et al., 2002; GARDNER; FENGER; LONDON, 2016).

A importância desse processo patológico torna evidente ao considerar que na clínica de pequenos animais, seu diagnóstico e tratamento têm se tornado uma parte considerável da casuística. Também pode gerar impacto considerável na saúde dos animais de produção e, de forma complementar, os animais acometidos ainda podem contribuir para estudos sobre a causa e tratamento do câncer humano (MCGAVIN; ZACHARY, 2009).

A população canina brasileira é a segunda maior do mundo, com 52,2 milhões de cães (IBGE, 2013). Tumores mamários caninos são o tipo mais comum de neoplasia em fêmeas não castradas e aproximadamente 40 a 50% são malignos (SORENMO, 2003). Entre os malignos, os mais frequentes são os carcinomas (MORRISON, 1988). As taxas de incidência variam de acordo com a localização geográfica tendendo a ser menor em países com maiores índices de castração precoce. As neoplasias benignas apresentam crescimento lento, delimitações bem evidentes e são livres de aderências aos tecidos contíguos. Assim, esses tumores são geralmente curáveis e dificilmente são a *causa mortis* do paciente. Já as neoplasias malignas possuem crescimento acelerado e invasivo, geram metástases, podem apresentar ulcerações, inflamações e infecções (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2008; MCGAVIN; ZACHARY, 2009). O acometimento de linfonodos regionais e a presença de metástases são relatados como marcadores de pior prognóstico (DE NARDI et al., 2002).

Em cadelas, até mesmo os índices prognósticos mais usados, como comprometimento do linfonodo e grau histológico, não demonstraram uma boa relação com seu comportamento clínico, sendo que a avaliação da expressão de um ou mais imunomarcadores tem se mostrado uma ferramenta mais fidedigna e conclusiva (THOMAS; BERNER, 2000; VEER et al., 2002). Marcadores de proliferação celular como

o Ki67 e PCNA são os mais estudados na tentativa de correlação ao seu comportamento clínico. Entretanto, Zuccari et al. (2008) chamam a atenção para a necessidade de pesquisas de novos marcadores que componham um painel mais completo, permitindo um diagnóstico e prognóstico mais preciso e criterioso. Saleen et al. (2019) enfatizaram a necessidade de estudos adicionais que investiguem a utilidade clínica de proteínas atuantes na MEC no prognóstico e terapêutica tumorais, tanto em cães como em humanos.

Segundo o Ministério da Saúde (2004), o câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres no Brasil e, portanto, um problema de saúde pública que tem atraído a atenção de pesquisadores em busca de um modelo adequado para estudos sobre a biologia dessa neoplasia e possíveis agentes terapêuticos.

Diversas similaridades com a anatomia e fisiologia humana principalmente nos sistemas urogenital, nervoso e musculo esquelético fazem com que o cão tenha sido usado em pesquisa e desenvolvimento de novas drogas por muito tempo (KHANNA et al., 2006).

Especificamente no que diz respeito aos tumores mamários, o cão é um modelo experimental adequado para o estudo dessas neoplasias em mulheres, pois os cães desenvolvem naturalmente tumores que compartilham muitas características de malignidade com os tumores desenvolvidos por humanas, também possuem carcinogênese e progressão tumoral aceleradas (KHANNA et al., 2006) e as glândulas mamárias canina e humana apresentam semelhanças que possibilitam associar o desenvolvimento tumoral entre essas espécies (PINHO et al., 2012).

O tratamento do câncer na medicina veterinária evolui de maneira concomitante ao da medicina humana (GARDNER; FENGER; LONDON, 2016). Os testes em cães ajudam a definir melhor a segurança e a atividade de novos agentes antineoplásicos, podendo também auxiliar na descoberta de novos biomarcadores e auxiliar o desenvolvimento de estratégias que aumentarão a taxa de sucesso desses medicamentos. Com isso, estudos em cães oferecem benefícios tanto na saúde humana como na saúde animal (GARDNER; FENGER; LONDON, 2016; KHANNA et al., 2006).

O presente estudo objetivou caracterizar as expressões das proteínas LOX, LOXL2 e HIF1A em amostras de neoplasias mamárias de cadelas e sua possível relação com a

avaliação prognóstica. Nossas hipóteses foram que a expressão dessas proteínas varia significativamente entre os diferentes tipos histológicos de neoplasias mamárias em cadelas, com maior expressão nos subtipos mais agressivos, e que LOX, LOXL2 e HIF1A são indicadores de mortalidade para sobrevivência pós-cirúrgica, sendo potenciais biomarcadores prognósticos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária**

A glândula mamária é formada por meio da modificação e especialização de glândulas sudoríparas apócrinas. Em cadelas, essas glândulas são distribuídas em duas fileiras paralelas, com um sulco central. Em fêmeas nulíparas apresentam-se bem pequenas, tornando-se edemaciadas, pendulares e confluentes com as vizinhas ipsilaterais (CASSALI, 2017). O número de pares de glândulas varia de acordo com o tamanho do animal, entre 4 e 6 nas raças maiores e normalmente 4 em raças menores (SLATTER, 2007). As glândulas são denominadas e numeradas de acordo com a sua localização anatômica em craniocaudal, torácicas craniais e caudais, abdominais craniais e caudais, e às inguiniais (RADOSTITS; MAYHEW; & HOUSTON, 2002) .

Histologicamente, as glândulas mamárias dos canídeos são classificadas de acordo com os conjuntos de adenômeros em glândula exócrina, composta, tubuloacínosa (ou tuboaoveolar) e apócrina. Cada glândula é composta por um corpo e papila mamária, cujo ápice desembocam os numerosos óstios dos ductos lactíferos principais (CASSALI, 2017).

### **2.2. Neoplasias mamárias em cães**

Os tumores mamários representam um grande desafio na clínica de pequenos animais, não apresentam predisposição racial, porém, cadelas mais idosas e não castradas são mais frequentemente acometidas (MORRISON, 1988). O principal fator de risco para o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas é a exposição prolongada e intensa do epitélio mamário a hormônios sexuais, tais como estrógeno,

prolactina e progesterona. Na espécie canina, a exposição prolongada da progesterona não se verifica somente durante a prenhez, mas também durante o meta-estro. Isto ocorre devido ao fato de a progesterona aumentar desde o fim do pró-estro atingindo valores de pico nos dias 10 e 25 do ciclo estral. Posteriormente há uma diminuição destes níveis até atingir o valor basal cerca de 3 meses após o início do aumento de progesterona no sangue (DE COSTER et al., 1979).

Assim como a maioria dos tumores, as neoplasias mamárias também surgem devido a mutações ou ativação anormal dos genes que controlam o crescimento celular, resultando em modificações progressivas de sua biologia, que são caracterizadas por alterações na proliferação, diferenciação e na interação das células com o meio extracelular (DA SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Em mulheres, a obesidade tem sido descrita como um fator de risco para neoplasias mamárias após a menopausa (CLEARY; GROSSMANN; RAY, 2010). Misdorp (2002) também cita a importância dos fatores nutricionais na etiologia desses tumores, pois possuem a capacidade de alterar tanto a concentração quanto a disponibilidade hormonal. Portanto, os tumores mamários caninos são neoplasias de etiologia multifatorial (PEREZ ALENZA et al., 2000).

Os tumores são mais frequentemente encontrados associados ao tecido glandular, entretanto também são descritos aderidos ao mamilo (WITHROW et al., 2007). Comumente, afetam mais de uma glândula e por vezes toda a cadeia mamária. Ainda, podem ser encontradas mais de uma massa tumoral, com diferentes tipos histológicos, em uma mesma glândula (PELETEIRO, 1994).

### **2.2.1. Diagnóstico**

O diagnóstico dessas neoplasias deriva da íntima relação entre os exames físicos, de imagem, citologia por agulha fina, histopatológico, imuno-histoquímico e molecular, dependendo diretamente da comunicação entre clínicos, cirurgiões, patologistas e imagenologistas (CASSALI, 2017).

A citologia é a técnica de escolha para exame de triagem, pois possibilita a diferenciação entre processos neoplásicos, inflamatórios, hiperplásicos e displásicos,

com uma boa relação custo-benefício e baixa taxa de complicações pós-colheita. As amostras devem ser obtidas em múltiplas áreas do mesmo tumor e de tumores diferentes presentes no mesmo animal, devido à intensa heterogeneidade tecidual dessas neoplasias. O melhor local para obter amostras mais representativas é a periferia das lesões, uma vez que a sua zona central é comumente constituída por tecido necrosado, o qual pode dificultar um correto diagnóstico. Também devem-se evitar as áreas flutuantes das lesões, pois é provável que a amostragem realizada resulte em um líquido de baixa celularidade (RASKIN; MEYER, 2010).

Já o exame histopatológico fornece embasamento para um correto diagnóstico, sendo eleito como padrão ouro para classificação e descrição dessas neoplasias. Deve ser realizado em todas as circunstâncias, pois permite o estabelecimento do prognóstico com elevada precisão (PELETEIRO et al., 2009). Pode ser realizada através de biópsia incisional ou excisional (CASSALI, 2011). O exame histopatológico também permite avaliar a infiltração tumoral na pele, tecidos moles e vasos adjacentes, detalhes histomorfológicos do tumor como presença ou ausência de pleomorfismo, grau de diferenciação, índice mitótico, presença ou ausência de necrose e avaliação da margem cirúrgica (CASSALI, 2011).

Com o intuito de uma análise histopatológica mais fidedigna, é imprescindível coletar amostras de diversas regiões da massa, buscando amostras que representem zonas de transição entre as lesões e os tecidos aparentemente são. Com isso é possível considerar também a inflamação tecidual e a presença de uma possível lesão displásica (PELETEIRO, 1994).

Em 1974, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou a primeira Classificação Histológica Internacional dos Tumores Mamários de Animais Domésticos (HAMPE; MISDORP, 1974), uma adaptação da classificação utilizada para tumores humanos. A segunda edição foi publicada em 1999 (MISDORP, 1999) e, em 2011, Goldschmidt e colaboradores classificaram as neoplasias mamárias caninas em epiteliais ou mesenquimais, das quais podem ser subclassificadas em malignas ou benignas. Também estão incluídas nesta proposta as hiperplasias e as alterações dos mamilos. A classificação histopatológica proposta por Goldschmidt et al., (2011) é considerada o padrão-ouro para classificação e está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1-** Classificação histológica de tumores mamários caninos proposta por Goldschmidt et al (2011).

<p><b>1. Neoplasias epiteliais malignas</b></p> <p>Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>Carcinoma simples</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubular</li> <li>• Túbulo-papilífero</li> <li>• Quístico-papilar</li> </ul> <p>Carcinoma micropapilar invasivo</p> <p>Carcinoma sólido</p> <p>Comedocarcinoma</p> <p>Carcinoma anaplásico</p> <p>Carcinoma em adenoma complexo/Tumor misto</p> <p>Carcinoma tipo complexo</p> <p>Carcinoma tipo misto</p> <p>Carcinoma ductal</p>	<p><b>2. Neoplasias epiteliais malignas– tipos especiais</b></p> <p>Carcinoma de células escamosas</p> <p>Carcinoma adenoescamoso</p> <p>Carcinoma mucinoso</p> <p>Carcinoma rico em lipídios</p> <p>Carcinoma de células fusiformes</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mioepitelioma maligno</li> <li>• Carcinoma de células escamosas</li> <li>• Carcinoma de células fusiformes</li> </ul> <p>Carcinoma inflamatório</p>
<p><b>3. Neoplasias malignas mesenquimais – sarcomas</b></p> <p>Osteossarcoma</p> <p>Condrossarcoma</p> <p>Fibrossarcoma</p> <p>Hemangiossarcoma</p> <p>Outros sarcomas</p>	<p><b>4. Carcinosarcoma - tumor mamário misto maligno</b></p>
<p><b>5. Neoplasias benignas</b></p> <p>Adenoma simples</p> <p>Adenoma papilar intraductal</p> <p>Adenoma ductal</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Com diferenciação escamosa</li> <li>• Fibroadenoma</li> <li>• Mioepitelioma</li> <li>• Adenoma complexo</li> <li>• Tumor misto benigno</li> </ul>	<p><b>6. Hiperplasia/Displasia</b></p> <p>Ectasiaductal</p> <p>Hiperplasia lobular (adenose)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regular</li> <li>• Com atividade secretora</li> <li>• Com fibrose interlobular</li> <li>• Com atipia</li> </ul> <p>Epiteliiose</p> <p>Papilomatose</p> <p>Alteração fibroadenomatosa</p> <p>Ginecomastia</p>
<p><b>7. Neoplasias do mamilo</b></p> <p>Adenoma</p> <p>Carcinoma</p> <p>Carcinoma com infiltração epidérmica</p>	<p><b>8. Hiperplasia/displasia do mamilo</b></p> <p>Melanose da pele do mamilo</p>

**Fonte:** modificado de Goldschmidt, M. et al. *Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, 2011. p. 117-131.

Entretanto, recentemente, ficou claro que muitos tipos tumorais são únicos para diferentes espécies animais e, portanto, uma simples adequação não seria o suficiente para fornecer um diagnóstico preciso e prognóstico para tumores em animais domésticos. Então, em 2019, Zapulli et al. publicaram a terceira e mais recente edição dessa classificação (ZAPULLI et al., 2019).

### 2.2.2. Graduação histológica

Como ferramenta de graduação da malignidade, pontuam-se o índice de formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e contagem de mitoses, conforme descrito na Tabela 2 (ELSTON; ELLIS, 1993).

**Tabela 2:** Graduação histológica dos tumores mamários caninos.

<b>Atributo</b>	<b>Escore</b>
<b>Índice de formação de túbulos</b>	
>75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
<10% do tumor	3
<b>Pleomorfismo Nuclear</b>	
Tamanho nuclear semelhante a uma célula normal (2 a 3 vezes o tamanho da hemácia)	1
Aumento moderado no tamanho e na variação	2
Marcada Variação	3
<b>Índice mitótico</b>	
0 a 8 mitoses/10 HPF	1
9 a 16 mitoses/10 HPF	2
17 ou mais mitoses/10 HPF	3

**Fonte:** Adaptado de (CASSALI et al., 2011).



O resultado obtido na soma dos escores citados acima caracteriza as neoplasias em grau I (soma entre 3 a 5 pontos), grau II (soma de 6 a 7 pontos) e grau III (quando a soma for 8 ou 9 pontos), e é utilizado como indicador prognóstico. Diversas características são consideradas na escolha do melhor procedimento clínico e/ou cirúrgico e na tentativa de prever o comportamento futuro dessa neoplasia, os marcadores prognósticos mais relevantes para os tumores mamários caninos são descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Resumo dos fatores prognósticos em neoplasias mamárias caninas.

<b>Favorável</b>	<b>Desfavorável</b>	<b>Indiferente</b>
<3 cm de diâmetro	>3 cm de diâmetro	Idade
Limites definidos	Invasivo, ulcerado	Raça
Positivo para RE e RP	Linfonodo positivo	Estado reprodutivo
Subtipo histológico: Carcinoma bem diferenciado, complexo e tubular/papilífero	Negativo para RE	Peso
Tumor grau I	Subtipo Histológico: Carcinoma pouco diferenciado, simples, sólido, anaplásico, inflamatório e sarcomas	Tipo de cirurgia (mastectomia parcial ou total)
Índice de proliferação:	Tumor grau II	Número de nódulos
Baixa contagem de AgNor	Índice de proliferação:	Glândula mamária envolvida
Baixa expressão de Ki67	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alta contagem de AgNOR</li> <li>○ Alta expressão de Ki67</li> <li>○ Alta expressão de PCNA</li> <li>○ Mutação do gene P53</li> <li>○ Aneuploidia do DNA</li> </ul>	

**Fonte:** Modificado de Giovani (2013).

Embora o painel imuno-histoquímico não seja comumente utilizado na rotina de cães e gatos, pesquisadores têm se dedicado em encontrar uma correta relação entre o comportamento clínico e os diversos marcadores existentes. (PEÑA et al., 2014) descreveram os principais marcadores imuno-histoquímicos utilizados:

- Marcadores de diferenciação celular:

- Testes de classe I: avaliados apenas de forma quantitativa, como positivo ou negativo, considerando as características morfológicas do tumor, onde é considerado positivo uma marcação de mais de 10%.
- Testes de Classe II: São usados na medicina humana para valor prognóstico ou preditivo, e levam em consideração a intensidade da marcação imuno-histoquímica, juntamente com a porcentagem de células marcadas.

- Marcadores de invasão estromal: Em tumores que apresentam proliferação mioepitelial, são recomendados o uso combinado de p63 (reatividade nuclear) e calponina ou queratinas basais (K5, K14).

- Detecção de micrometástase de linfonodo e células tumorais circulantes: Imuno-histoquímica para queratinas são úteis em linfonodos negativos para metástases à H&E na detecção de células neoplásicas únicas ou em pequenos grupos.

- HER2 (Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2): Utiliza-se uma pontuação 0, 1 +, 2 + e 3 +, e apenas tumores 3 + são considerados positivos.

- Receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP): A metodologia proposta é denominada “Allred” que avalia a proporção de células com marcação nuclear positiva mais a intensidade da marcação imunológica, e são classificados em: luminal A, RE e/ou RP positivos, HER-2 negativo e Ki-67 baixo (<14%); luminal B HER-2 negativo, RE e/ou RP positivos, HER-2 negativo e Ki-67 alto (≥14%); luminal B HER-2 positivo, RE e/ou RP positivos e HER-2 positivo; HER-2 superexpresso (não luminal), RE e RP negativos e HER-2 positivo; e triplo-negativo, ausência de expressão de RE, RP e HER-2 (GOLDHIRSCH et al., 2011).

O sistema TNM, proposto pela Organização Mundial de Saúde, fornece embasamento ao clínico na instituição da terapêutica. O estadiamento considera as seguintes variáveis:

- Tamanho do tumor primário (T), é considerado um dos mais importantes fatores já estabelecidos para avaliação prognóstica do câncer mamário humano, e considerado na abordagem clínica de tumores mamários caninos.

- Comprometimento dos linfonodos regionais (N)

- Presença de metástase (M) no momento do diagnóstico, que é avaliada por meio da realização de ultrassonografia abdominal e radiografias torácicas (CASSALI, 2011). A Tabela 4 resume os critérios para definição do estadiamento.

**Tabela 4-** Critérios para estadiamento clínico do carcinoma mamário canino.

<b>T: Tamanho do tumor</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• T1: Menor que 3 cm de diâmetro               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Não aderido; b. aderido à pele; c. aderido à musculatura</li> </ul> </li> <li>• T2: entre 3 e 5 cm de diâmetro               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Não aderido; b. aderido à pele; c. aderido à musculatura</li> </ul> </li> <li>• T3: maior que 5 cm de diâmetro               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. Não aderido; b. aderido à pele; c. aderido à musculatura</li> </ul> </li> </ul>
<b>N: Comprometimento de linfonodos regionais</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• N0: sem envolvimento neoplásico</li> <li>• N1: com envolvimento neoplásico               <ul style="list-style-type: none"> <li>a. não aderido; b. aderido</li> </ul> </li> </ul>
<b>M: metástase à distância</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• M0: ausência de metástases à distância</li> <li>• M1: presença de metástases à distância</li> </ul>

**Fonte:** adaptado de (OWEN, 1980)

Em 2003, Sorenmo publicou uma versão modificada desse sistema, onde os estadios são denominados I, II e III e fazem referência ao tamanho do tumor primário, metástases em linfonodos constitui doença em estadio IV, independentemente do tamanho do tumor, já a presença de metástase à distância demonstram doença em estadio V (Tabela 5).

**Tabela 5-** Estadiamento de tumores mamários caninos.

Estadio	Tamanho do tumor	Status do linfonodo	Metástase
I	T1 < 3cm	N0	M0
II	T2 3-5cm	N0	M0
III	T3 > 5cm	N0	M0
IV	Qualquer	N1 (positivo)	M0
V	Qualquer	Qualquer	M1 (metástase)

**Fonte:** Sorenmo et al. (2013)

### 2.2.3. Tratamento

A exérese tumoral é o método de escolha para o tratamento da maioria dos cães diagnosticados com lesões na glândula mamária, apenas não sendo indicado em casos de carcinoma inflamatório. Esse procedimento tem como principal objetivo o controle regional da doença e é o tratamento associado à maior probabilidade de cura em cães com diagnóstico inicial (CASSALI, 2017).

A escolha entre as diferentes extensões cirúrgicas varia de acordo com o estadiamento, drenagem linfática, tamanho e localização das lesões (SORENMO, 2003). Os linfonodos regionais (axilares e inguinais), devem passar por avaliação macroscópica e citológica, e casos estejam afetados, devem ser removidos (QUEIROGA; LOPES, 2002).

Tumores com características histopatológicas mais agressivas requerem uso de terapias adicionais, como a quimioterapia, entretanto existe pouca informação em

relação à eficácia de quimioterápicos na espécie canina, contrariamente à espécie humana (LANA; RUTTEMAN; WITHROW, 2019).

A literatura propõe principalmente o uso de doxorubicina associada a ciclofosfamida ou cisplastina, ou ainda carboplatina sem associações. O tamoxifeno também é indicado por alguns autores, associado a dietas com altos níveis de proteína e baixos níveis de gordura (MORRISON, 1988; WITHROW et al., 2007). A grande variação histológica verificada nesses tumores torna mais difícil a caracterização da quimiossensibilidade dos diferentes subtipos histológicos. A barreira para a utilização destes fármacos é acrescida pelo fato de nem sempre as metástases à distância terem as mesmas características do tumor primário, nem reagirem da mesma maneira à quimioterapia (QUEIROGA; LOPES, 2002).

### **2.3. Microambiente tumoral**

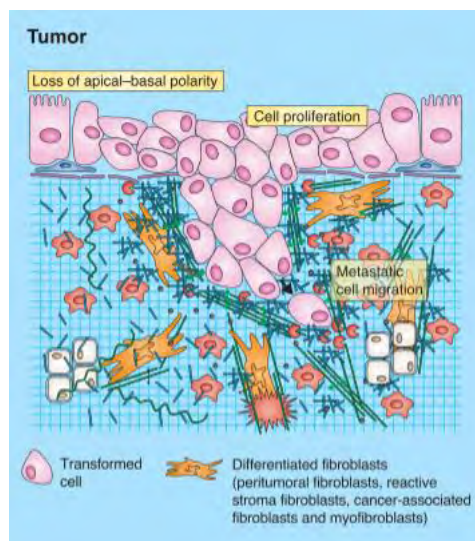
A matriz extracelular (MEC) é uma complexa rede tridimensional de macromoléculas, composta por colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, lamininas e várias outras glicoproteínas (THEOCHARIS et al., 2016). Trata-se de um dos principais componentes do microambiente tumoral, juntamente com a vascularização e células do sistema imune. Seus componentes ligam-se uns aos outros, bem como aos receptores de adesão celular conferindo o suporte estrutural do tecido, comunicação entre as células e regulação de processos celulares (NARANJO; NOGUERA-SALVÁ; GUERRERO, 2009).

As macromoléculas que compõem a MEC podem ser classificadas em: proteoglicanos (PGs) e proteínas fibrosas. Os PGs são responsáveis pelo preenchimento de grande parte do espaço intersticial extracelular, formando um gel hidratado, além de possuírem uma vasta gama de funções, sendo responsável pelo tamponamento, hidratação, ligações e resistência (HYNES; NABA, 2012; JÄRVELÄINEN et al., 2009; SCHAEFER; SCHAEFER, 2010). Já as principais proteínas fibrosas são os colágenos, elastinas, fibronectinas e lamininas. Os colágenos são responsáveis por boa parte de suas atribuições físicas (FILIPE; CHITTY; COX, 2018). Já a elastina, encontra-se frequentemente associada ao colágeno, com características flexíveis e dinâmicas. São

compostas por dois elementos: uma forma amorfa de elastina, no centro, e um manto externo, composto por microfibrilas glicoproteicas. Essa forma amorfa de elastina é obtida a partir da reticulação de moléculas solúveis de tropoelastina secretada (proteína precursora da elastina), que se tornam insolúveis e estáveis pela ação da enzima lisil-oxidase (LOX) ou outros membros desta família (FILIFE; CHITTY; COX, 2018; WEIHERMANN et al., 2017). A MEC está presente em todos os organismos e órgãos e não se trata meramente de um enchimento intercelular, mas sim um componente fisiologicamente ativo de tecido vivo, responsável pela comunicação célula-célula, adesão e proliferação celular (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Por se tratar de uma estrutura altamente dinâmica, é constantemente remodelada por meio da ação de várias enzimas que a degradam em situações normais e patológicas. A regulação incorreta da composição e estrutura da MEC está relacionada ao surgimento e progressão de diversos processos patológicos (THEOCHARIS et al., 2016).

O microambiente tumoral é fundamental em todos os aspectos da iniciação e progressão do tumor, fato que tem conduzido o direcionamento de proteínas extracelulares. No processo de progressão tumoral, a MEC atua em diferentes estágios (Fig. 1). Durante a proliferação celular, por exemplo, se liga a fatores de crescimento e auxilia na síntese dos mesmos, ou seja, tem a capacidade de influenciar a proliferação celular tumoral (BISSELL; RADISKY, 2001) e a formação de metástases (BISSELL; RADISKY, 2001; PULZ et al., 2017).

Os genes responsáveis por codificar proteínas de remodelação da MEC são associados à regulação positiva no estroma tumoral, enquanto a desregulação desses genes predispõe ao surgimento de metástases e resistência a medicamentos em cânceres de mama em humanos, corroborando com os resultados encontrados na medicina veterinária (HELLEMAN et al., 2008).



Fonte: adaptado de Frantz; Stewart; Weaver (2010)

## 2.4. LOX e LOXL2

A família das lisil-oxidases é composta por LOX e 4 enzimas semelhantes à lisil-oxidase denominadas LOXL-1 a 4. Cada proteína difere das demais em sua sequência N-terminal, que pode conferir funções individuais, sendo totalmente funcionais, porém, geneticamente diferentes. São amino-oxidases cobre-dependentes às quais é atribuído um importante papel no câncer e em doenças vasculares e fibrosantes (CSISZAR, 2001). Atuam na remodelação da MEC por meio da conversão de lisina e hidroxilisina presentes no colágeno e elastina, que é importante para aumentar a resistência à tração e, portanto, a integridade estrutural de muitos tecidos. Elas contêm um domínio catalítico e um domínio semelhante ao receptor de citocina em seus terminais C, sendo, portanto, responsáveis pela homeostase dos tecidos conjuntivos (GRAU-BOVÉ; RUIZ-TRILLO; RODRIGUEZ-PASCUAL, 2015).

Podem apresentar localizações intracelulares e intranucleares distintas, com diferentes funções, porém, sempre relacionadas, incluindo o controle do crescimento celular, supressão tumoral, senescência e quimiotaxia (MOLNAR et al., 2003a). Fisiologicamente, a expressão dos membros da família LOX é rigorosamente controlada e ocorre em diversos tecidos e órgãos como pele, aorta, coração, pulmão, fígado, cartilagem, entre outros. Entretanto, disfunções na expressão dessas proteínas estão relacionadas a diversas doenças associadas à MEC, bem como muitos tipos de câncer (AUMILLER et al., 2017; BARKER; COX; ERLER, 2012).

As lisil-oxidases são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa extracelular de resíduos de lisina em elastina e de lisina e hidroxilisina em precursores de colágeno, processo este que resulta na geração de aldeídos (KIM; KIM; KIM, 2011). Além da ativação por clivagem proteolítica extracelular, as lisil-oxidases também podem estar ativas dentro da célula. Um exemplo disso é a LOXL2, que é capaz de modular eventos intracelulares, como a transição epitelial-mesenquimal (WU; ZHU, 2015).

A proteína LOXL2 inclui um peptídeo inicial e, na porção N-terminal, quatro domínios receptores ricos em cisteína (SRCR) e um domínio catalítico LOX conservado (CSISZAR, 2001). Janyasupab et al. (2016) mediram os níveis da proteína LOXL2 em soro, plasma e urina de pacientes humanos, e verificaram que os pacientes com câncer de mama apresentaram níveis mais elevados de LOXL2 no sangue, em comparação com os indivíduos sem câncer. A alta expressão das enzimas LOX e LOXL2 é considerada um fator de risco para o surgimento precoce de metástases em vários tipos de câncer (UMEZAKI et al., 2019). Essas enzimas têm a capacidade de promover a migração e invasão de células tumorais, estimulando a remodelação da matriz extracelular e interagindo com fatores de crescimento (LEVENTAL et al., 2009).

Da maneira análoga, Joselevitch et al. (2023) demonstraram através da análise imuno-histoquímica que a alta expressão de LOX em citoplasma de mastócitos neoplásicos é um indicador de mau prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. Wu et al. (2007) demonstraram que essa enzima é capaz de induzir a transição epitelial-mesenquimal (EMT), permitindo maior invasão por células tumorais e facilitando a formação de metástases. A expressão de LOX foi estatisticamente associada à ausência de receptores de estrogênio (RE), corroborando a descoberta que tumores “mais hipóxicos” possuem maior probabilidade de não expressarem esses receptores (CHI et al., 2006). Sabe-se que pacientes humanos com câncer de mama que não expressaram receptores de estrogênio apresentam pior prognóstico (PALMIERE et al., 2005).

Baker et al. (2013) demonstraram que LOX tem a capacidade de aumentar a expressão de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e, dessa forma, promover a angiogênese tumoral. Saleen et al. (2019) avaliaram a expressão gênica de LOX por reação em cadeia da polimerase em tempo real em tumores mamários caninos e demonstraram expressão três vezes maior de LOX nos tumores em comparação com



tecido mamário de animais saudáveis, corroborando com resultados encontrados em pacientes humanos, nos quais a expressão de LOX foi 78% maior em tecidos tumorais em estágio avançado em comparação às células normais (ZHU et al., 2021).

Supõem-se que os membros da família LOX desempenhem um papel paradoxal na carcinogênese, agindo tanto como supressores de tumores quanto como promotores de metástases, dependendo de sua localização. De modo geral, quando essas proteínas atuam remodelando o microambiente tumoral através de sua atividade catalítica são capazes de favorecer a carcinogênese e a metastatização. Divergentemente, a ação intracelular dessas proteínas leva à transcrição e à tradução de oncogenes como o HRAS e o BCL2 (BARKER; COX; ERLER, 2012).

Dado o envolvimento dos membros da família LOX em diversas funções intra e extracelulares que afetam a sinalização, transcrição e tradução, bem como contribuem para alterações na adesão celular, motilidade e proliferação, justifica-se o interesse em estudar as enzimas LOX e compreender suas influências no microambiente tumoral e no nicho metastático.

## **2.5. HIF1A**

Até o momento, foram descritas três isoformas de Fatores Induzíveis por Hipóxia (HIF): HIF1, HIF2 e HIF3. O fator mais estudado é o HIF1, um heterodímero que consiste em duas proteínas, HIF1A e HIF1 $\beta$ , que medeiam a adaptação às mudanças na oxigenação tecidual. A expressão de HIF1A é determinada pelas taxas de síntese e degradação proteica. A via que regula sua síntese é independente de O<sub>2</sub>, enquanto a que regula sua degradação é dependente de O<sub>2</sub> (SEMENZA, 2003).

HIFs são complexos transcricionais que respondem aos níveis de oxigênio nas células. Eles são regulados por enzimas sensíveis ao oxigênio chamadas proli-hidroxilases (PHDs). Uma vez hidroxilado, ele se liga à proteína Von Hippel Lindau (VHL) para sua degradação. Em condições de normóxia, as PHDs direcionam os HIFs para degradação. No entanto, em condições de hipóxia, as PHDs são inibidas, permitindo que os HIFs se acumulem no núcleo e ativem a transcrição de oncogenes. Os HIFs controlam

funções celulares importantes, como proliferação e metabolismo, em resposta à hipóxia (INFANTINO et al., 2021; PEZZUTO; CARICO, 2019)

A hipóxia tumoral ocorre, essencialmente, quando o crescimento do tumor supera a angiogênese local (FOLKMAN, 1990). As concentrações de oxigênio são marcadamente reduzidas em diversos tipos de câncer em comparação com o tecido saudável e o principal mecanismo que medeia as respostas adaptativas à hipóxia é regulado pelo HIF1 (SEMENZA, 2009). Wong et al., (2011) demonstraram que os HIFs são importantes reguladores da formação do nicho metastático e atuam por meio da ativação transcricional específica de genes que codificam vários membros da família LOX.

A hipóxia intratumoral é uma característica marcante de quase todos os tumores sólidos, que induz a expressão de HIF1, gerando a liberação de LOX no microambiente e influenciando a expressão das metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que causam a degradação da membrana basal e facilitam a formação de metástases (PULZ et al., 2017; SCHIETKE et al., 2010).

As células cancerosas possuem a capacidade de alterar o próprio metabolismo a fim de se adaptar às baixas concentrações de oxigênio, com reprogramação da expressão gênica e alterações proteômicas que afetam várias funções celulares e fisiológicas, incluindo metabolismo energético, vascularização, invasão e metástase, instabilidade genética, imortalização celular, manutenção de células-tronco e resistência à quimioterapia (SEMENZA, 2013). Células saudáveis reduzem a sua proliferação sob condições de baixo oxigênio, entretanto, mutações que ocorrem em células cancerosas possibilitam a proliferação celular mesmo em ambientes hipóxicos (STRICKAERT et al., 2017).

Bos et al., (2001) relataram superexpressão de HIF1 em lesões precursoras (carcinoma ductal *in situ*) e de câncer de mama em estágio inicial. Também demonstraram que os níveis dessa proteína se correlacionam fortemente com o grau e invasão tumoral de câncer de mama humano. É comum encontrar concentrações elevadas de HIF1A nas margens de áreas necróticas, como o núcleo de tumores caracterizados por uma baixa disponibilidade de oxigênio (DE HEER; JALVING; HARRIS, 2020).

Em condições normais, a taxa de crescimento celular é restringida pela capacidade de difusão de oxigênio proveniente dos vasos sanguíneos. No entanto, a angiogênese possibilita que os tumores continuem a crescer ao fornecer nutrientes e oxigênio adicionais. A atividade do HIF impulsiona a formação de novos vasos sanguíneos. No entanto, a microvasculatura resultante desse processo no ambiente tumoral é desorganizada e permeável, diferentemente da angiogênese observada em tecidos saudáveis. Essa condição promove a hipóxia intratumoral e facilita a disseminação metastática, além de dificultar a eficácia da liberação de drogas terapêuticas e a resposta imune antitumoral (KHAN; KERBEL, 2018).

De Heer, Jalving e Harris (2020) destacaram a importância da atividade do HIF1A para a agressividade, progressão e resistência à terapia do câncer de mama, justificando estudos que correlacionem as alterações angiogênicas e metabólicas com a clínica desses pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

Caracterizar a expressão imuno-histoquímica das proteínas LOX, LOXL2 e HIF1A em amostras de neoplasias mamárias de cadelas com o intuito de avaliação prognóstica, comparando os dados obtidos aos tipos histológicos, à mortalidade em função do tumor e à sobrevida pós-cirúrgica.

Verificar a expressão de LOX e HIF1A *in vitro* em condições de hipóxia e anóxia.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram utilizadas amostras de tumores mamários de cadelas oriundas do Hospital Veterinário e do Banco de tumores do Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), bem como do arquivo histopatológico da FCAV-UNESP (Jaboticabal). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Nº de inscrição no CEUA: 7498190221).

#### **4.1. Critérios de inclusão e acompanhamento clínico**

Foram incluídos casos de neoplasias mamárias tratadas cirurgicamente por excisão tumoral com intuito curativo, utilizando amplas margens cirúrgicas. O acompanhamento clínico mínimo estipulado para os casos censurados pela análise de sobrevivência foi de 180 dias. Foram censurados os casos de pacientes mortos por causa não relacionada ao tumor, com histórico clínico interrompido e vivos ao final do estudo. Os dados clínicos foram obtidos por análise de prontuários hospitalares e/ou entrevistas com proprietários e veterinários responsáveis até o dia 01/05/2023. Também foram registradas informações como raça, idade ao diagnóstico, localização da lesão, data de surgimento do tumor, data da primeira consulta e data da cirurgia, além da ocorrência de recidiva, metástase e realização de quimioterapia adjuvante.

#### **4.2. Processamento histopatológico**

As amostras foram fixadas em solução de formol a 10% por até 48h e processadas de acordo com a técnica rotineira de embebição em parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina para confirmação do diagnóstico e da graduação histológica das lesões. Os tumores foram classificados e graduados por três observadores simultâneos, segundo a proposta de Goldschmidt et al. (2011), sendo o diagnóstico final decidido por consenso. A partir das lâminas em H&E, foram selecionadas as que melhor representavam cada caso para a técnica de imunohistoquímica, ou seja, em situações de múltiplas lesões ou múltiplos subtipos histológicos, foram selecionados os de maior agressividade segundo a literatura disponível (BRUNETTI et al., 2021; RASOTTO et al., 2017).

#### **4.3. Validação do anticorpo por *Western blotting* (WB)**

Para validação do anticorpo anti-LOX (PA1-46020, Invitrogen) utilizado na imunohistoquímica, uma vez que o mesmo não possui indicação em bula para tecidos caninos, realizamos a técnica de WB em amostras de carcinoma mamário canino. Como controles positivo e negativo da técnica, foram utilizadas amostras de pulmão e baço de camundongo, correspondentes aos tecidos com maior e menor expressão da proteína de interesse, respectivamente.

Para a extração de proteínas, as amostras foram descongeladas em gelo, pesadas, cortadas em fragmentos menores com o auxílio de lâmina de bisturi em uma placa de Petri. Esses fragmentos foram transferidos para um tubo Falcon contendo Tampão RIPA para lise celular e inibidores de fosfatase e de protease. Com a ajuda de um homogeneizador elétrico de bancada, o tecido foi triturado até não restarem partículas macroscópicas. A solução obtida ficou sob agitação constante a 4°C durante 2 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 20 minutos a 4°C, coletando-se o sobrenadante e descartando-se o *pellet*.

Como as amostras de camundongo são de tamanho reduzido em comparação às amostras de cães, o protocolo de extração dessas amostras teve que ser repetido 3 vezes, com alterações na proporção de tampão e na técnica até alcançar uma concentração adequada de proteína para utilização no Western Blotting.

Para certificar se a extração de proteína foi bem-sucedida, assim como determinar a concentração da mesma em cada amostra, foi utilizado o método de Bradford, que consiste em medir a absorbância das amostras em comparação com uma curva padrão, de concentração conhecida. Nesse caso, foram utilizadas como curva padrão diferentes concentrações de albumina bovina. As proteínas de cada tecido foram diluídas nas seguintes concentrações: 1:10, 1:30 e 1:50, pipetadas em duplicata para microplaca de 96 poços, adicionado o reagente Bradford onde foram obtidas as absorbâncias no espectrofotômetro a 595nm.

Por meio da equação da reta e ajustando o fator de diluição, foi determinada a concentração proteica de cada amostra para ser utilizada no WB (Tab. 5). Como as amostras de camundongo resultaram em uma menor extração proteica, não foi possível realizar mais diluições para quantificação com o método Bradford. Considerando que essa substância reage com o tampão RIPA, esse método não poderia ser utilizado sem a amostra estar diluída, portanto, optou-se por outro método de quantificação de proteínas (BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), utilizando apenas as diluições 1:2 e 1:10 (Tab. 6). Com esse Kit, foi possível obtermos as concentrações proteicas em cada amostra de camundongo.

**Tabela 6-** Concentrações proteicas de acordo com o tecido e diluição utilizada para quantificação.

	<b>Tecido</b>	<b>Diluição</b>	<b>Concentração Final mg/ml</b>
<b>Amostras Cão (Bradford)</b>	Pele	01:10	0,95
	Mastocitoma	01:50	5
	Carcinoma mamário	01:20	9,37
	Rim	01:10	7,49
	Fígado	01:50	3,32
<b>Amostras camundongo (BCA)</b>	Baço	01:10	8,29
	Rim	01:10	4,94
	Pulmão	01:10	14

O gel de isolamento foi obtido misturando-se em um béquer os reagentes Resolver A, Resolver B (Kit Bio Rad), Temed e APS. Essa solução foi transferida para o molde e polimerizada durante 30 minutos. Da mesma forma, o gel de empilhamento foi produzido com a mistura dos reagentes Staker A, Staker B (Kit Bio Rad), Temed e APS, utilizado um pente de 10 poços e polimerização do gel por 30 minutos.

As proteínas foram desnaturadas em termociclador por 5 minutos a 95°C e misturadas com Laemiler na proporção de 1 de Laemiler para 4 de amostra. Em cada poço, foram adicionadas de 10 e 20 mg de proteína. As amostras já diluídas com Laemiler e o *ladder* foram pipetados no gel previamente preparado com tampão de corrida. A membrana de PVDF foi ativada com metanol por 1 minuto e lavada com tampão de transferência. A transferência das proteínas foi realizada no *Trans Blot Turbo* com um protocolo de 7 minutos.

A membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com tampão de lavagem TBST, e cortada de modo a separar a amostra específica para cada anticorpo, permitindo a incubação separadamente. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro fetal bovino a 5% durante 1 hora, e as tiras da membrana incubadas *overnight* com anticorpos primários policlonal anti-LOX (PA1-46020, Invitrogen). Após nova lavagem em tampão TBST, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário (LSAB+System-HRP, EasyLink

One®, EasyPath®). As ligações foram reveladas com a solução Clarity® (Clarity Western ECL Blotting Substrate), possibilitando a visualização das bandas no ChemiDoc Imaging Systems | Bio-Rad.

#### **4.4. Caracterização da expressão das proteínas LOX e HIF1A *in vitro***

A caracterização da expressão das proteínas LOX e HIF1A *in vitro* foi realizada em células de carcinomas mamários canino e humano expostas a condições de hipóxia e normóxia, no período de maio a julho de 2022, na Universidade de Pádova (Itália), sob a orientação da Profa. Dra. Valentina Elena Giuditta Zappulli.

Três linhagens celulares foram utilizadas: (1) CIPp, células de adenocarcinoma mamário primário canino (UYAMA et al., 2006); (2) CIPm, células de metástase em linfonodo regional de um carcinoma tubular sólido canino (UYAMA et al., 2006); e (3) MDA-MB 231, linhagem celular comercial de câncer de mama humano, obtida de uma paciente com adenocarcinoma, em 1973, gentilmente cedida pela prof<sup>a</sup>. Raffaella de Maria (Universidade de Turim, Itália).

As linhagens celulares CIPp e CIPm foram cultivadas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 99% umidade com meio RPMI 1640 com L-glutamina (ThermoFisher®) e MDA-MB-231 em meio DMEM (ThermoFisher®), ambos suplementados com penicilina e estreptomicina a 1% (pen/strep, ThermoFisher®) e 10% de soro fetal bovino (PAN-Biotech®).

##### **4.4.1. Ensaio de proliferação celular**

As células foram semeadas em placas de 96 poços nas seguintes densidades: 5.500 CIPp, 3.600 CIPm e 10.700 células MDA-MB231 por poço, considerando o tempo de duplicação específico de cada linhagem. Decorridas 24 horas, e atingido 80% de confluência, três poços por linhagem foram submetidos a tratamento com as respectivas concentrações dos reagentes indutores de hipóxia. A hipóxia foi simulada mediante a aplicação de dicloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>-Merck KGaA) em quatro concentrações distintas (200, 100, 50 e 10 µmol). Alternativamente, utilizou-se a combinação de glicose oxidase/catalase (GOX/CAT - Merck KGaA) em três dosagens distintas (1:100.000 GOX/1:50.000 CAT; 1:200.000 GOX/ 1:100.000 CAT e 1:10.000

GOX/1:5.000 CAT). Três poços serviram como controle (sem tratamento) para cada linhagem. Os poços de referência (branco) foram preenchidos com o meio apropriado para cada condição experimental.

Após 24 e 48 horas do início do tratamento, foi conduzido o ensaio MTS, um método utilizado para medir a viabilidade celular *in vitro*. O reagente CellTiter96 Aqueous One Solution (Promega) foi equilibrado à temperatura ambiente por 90 minutos e subsequente adição de 20 µL em cada poço. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C por uma hora, seguido da mensuração da absorbância a 490 nm utilizando-se o leitor de placas com capacidade para 96 poços (Victor, PerkinElmer). O experimento foi realizado em duplicata para cada linhagem celular.

#### **4.4.2. Ensaio de migração celular**

O ensaio de "scratch" ou raspagem foi utilizado com o intuito de avaliação da migração celular. No dia 0 do experimento, foram semeadas 240.000 células CIPm e 500.000 células MDA-MB231 por poço em placas de 6 poços. Após 48 horas, as células haviam alcançado confluência completa, formando uma monocamada uniforme. Utilizando uma ponta de pipeta esterilizada, foram realizadas duas raspagens lineares, simulando uma "ferida". Posteriormente, procedeu-se com a remoção do meio de cultura, seguido de lavagem com tampão fosfato salino (PBS) 1X. O meio fresco, contendo os agentes de tratamento (CoCl<sub>2</sub> nas concentrações de 10 e 50 µmol), foi adicionado.

Para a captura e avaliação das Imagens, foram estabelecidos três pontos de referência próximos às feridas. Imagens destas áreas foram registradas (três imagens por incisão, totalizando seis imagens por poço). A captura de imagens foi realizada utilizando um microscópio invertido (IX50, Olympus) à objetiva de 10x nos intervalos de tempo: T0 (15 minutos após a raspagem), T1 (4 horas), T2 (8 horas) e T3 (24 horas).

A análise realizada foi quantitativa, medindo a largura das incisões em cada ponto de referência. Foram realizadas dez medições individuais por referência utilizando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).



#### 4.4.3. Quantificação de LOX e HIF1A em células expostas a condições de hipóxia e normóxia

Foram semeadas  $5 \times 10^6$  células da linhagem MDA-MB231 e  $1,9 \times 10^6$  células da linhagem CIPm em placas de 150 mm contendo meio isento de tratamento. Estabeleceu-se uma placa específica para cada condição de tratamento com  $\text{CoCl}_2$  (nas concentrações de 100, 50 e 10  $\mu\text{mol}$ ), bem como uma placa destinada ao grupo controle. Após 24 horas da semeadura, o meio de cultura foi substituído pelo respectivo meio de tratamento. Para as células do grupo controle, manteve-se a adição de meio isento de qualquer tratamento. Após 24h de tratamento do meio, as células foram preparadas para análise proteica através da remoção do meio, seguido por duas lavagens com PBS resfriado.

Procedeu-se com a adição de tampão RIPA contendo inibidores de protease (ThermoFisher) e incubou-se em gelo por um período de 5 minutos. Utilizando-se de um raspador, as células foram coletadas e o lisado celular foi transferido para microtubos.

As amostras foram submetidas à centrifugação a  $14.000 \times g$  durante 15 minutos, descartando-se o *pellet* e preservando o sobrenadante, o qual foi transferido para um novo microtubo e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  para futuras análises.

A determinação da concentração proteica foi realizada através do Kit Pierce BCA Protein Assay (ref.: #23225/23227, Thermo Scientific).

Em uma placa de 96 poços, foram adicionadas triplicatas de cada amostra e padrões de albumina. Para as amostras, foram empregadas diluições de 1:1 e 1:10, totalizando 25  $\mu\text{L}$  em cada poço. A cada poço foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do reagente BCA. Protegendo a placa da incidência de luz com papel alumínio, a mesma foi agitada por 30 segundos e incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

Posteriormente, a quantificação proteica foi efetuada mediante a leitura de absorbância no leitor de placas (Victor, PerkinElmer). Para o WB, as amostras de proteínas foram preparadas conforme mostrado na Tabela 7.

Cada poço, foi carregado com 20  $\mu\text{g}$  de proteínas. As amostras foram submetidas à desnaturação a uma temperatura de  $95^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Thermo

Fisher Scientific) e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A eficiência da transferência proteica foi avaliada através do corante Ponceau.

**Tabela 7:** Amostras carregadas no gel, respectivas composição e localização.

<b>Amostra</b>	<b>Proteínas (<math>\mu</math>l)</b>	<b>B-mercaptoetanol</b>	<b>PBS</b>	<b>localização no gel</b>
<b>LADDER</b>		0		1
<b>MDA-MB231 controle</b>	21	0	1,5	2
<b>MDA-MB 10UM</b>	21	0	1,5	3
<b>CIPm control</b>	9,4	0	13,1	4
<b>CIPm 10UM</b>	21	0	1,5	5
<b>CIPm 50UM</b>	8,2	0	14,3	6
<b>CIPm 100UM</b>	21	0	1,5	7
<b>LADDER</b>			0	8
<b>MDA-MB231 controle</b>	21	1,5	0	9
<b>MDA-MB 10UM</b>	21	1,5	0	10
<b>CIPm 50UM</b>	8,2	1,5	12,8	11
<b>CIPm 10UM</b>	21	1,5	0	12
<b>CIPm controle</b>	9,4	1,5	11,6	13
<b>CIPm 100UM</b>	21	1,5	0	14

A membrana foi incubada com este corante por 5 minutos em um misturador orbital à temperatura ambiente. Após avaliação, a membrana foi lavada com TBST para completa remoção da coloração.

A membrana foi tratada com uma solução de 5% de leite desnatado em TBS-T (TBS com 0,05% de Tween-20) por 90 minutos à temperatura ambiente para bloqueio de sítios inespecíficos.

Conforme especificado na Tabela 8, os *blots* foram incubados com anticorpos primários de coelho ou camundongo, diluídos em 1% de leite desnatado em TBS-T, a 4°C, durante a noite. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado com peroxidase nas diluições de 1:3000 (policlonal de cabra anti-coelho, #32260; ou anti-camundongo, #32230, Thermo Fisher Scientific) por 1 hora em temperatura ambiente.

Detecção: As bandas proteicas foram detectadas utilizando o kit SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) e visualizadas com o equipamento iBright1500 (Thermo Fisher Scientific).

**Tabela 8:** Anticorpos utilizados, suas respectivas concentrações e pesos moleculares preditos.

Anticorpo Primário	Concentração	Anticorpo Secundário	Concentração	Peso molecular predito (kDa)
<b>LOX</b> <b>(policlonal Invitrogen®</b> <b>PA1-46020)</b>	1:2.000	Anti-rabbit	1:3.000	52
<b>HIF1A</b> <b>(policlonal,</b> <b>RheaBiotech®, IM-</b> <b>0374)</b>	1:2.000	Anti-rabbit	1:3.000	93
<b>β-actin</b> <b>(Abcam® 8226)</b>	1:4.00	Anti-mouse	1:3.000	43

#### 4.5. Processamento imuno-histoquímico

Para desparafinização, todas as lâminas foram incubadas em estufa a 60°C por 50 minutos e passaram por banhos em xilol (I e II, 15 minutos em cada) e álcool seriado (100%, 95% e 70%) 5 minutos em cada. As etapas seguintes estão descritas na Tabela 9.

Para a proteína LOX, foram processadas 52 amostras utilizando o anticorpo primário policlonal de coelho anti-LOX de rato (PA5-27270, ThermoFisher) na concentração de 1:200. Como controle positivo, foi utilizado carcinoma mamário humano, conforme indicado em bula, e, para controle negativo, o anticorpo primário foi omitido e substituído por IgG de coelho na mesma diluição do anticorpo primário.

Para HIF1A, foram processadas 82 amostras com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-HIF1A humana (cód. IM-0374, Rheabiotech®), que foi incubado durante 30 min a 25°C na diluição de 1:200. Cortes histológicos com áreas de necrose foram utilizadas como controle positivo da técnica e os controles negativos foram realizados com IgG de coelho na mesma concentração e condições do anticorpo primário.

A pesquisa pela proteína LOXL2 foi realizada em 70 amostras com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-LOXL2 humana (LS-A9350-50, LSBio, LifeSpan Biosciences). Como controle positivo, foi utilizado carcinoma mamário humano, conforme indicado em bula, e, para controle negativo, o anticorpo primário foi omitido e substituído por IgG de coelho na mesma diluição do anticorpo primário.

As lâminas foram incubadas a 4°C, em câmara úmida e escura, *overnight*. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário EasyLink One (LSAB+System-HRP) por 25 minutos em temperatura ambiente.

**Tabela 9:** Etapas da técnica de imuno-histoquímica

Anticorpo	Etapa	Reagente
<b>LOX</b>	Recuperação antigênica	Tampão Citrato pH 6,0, 25 minutos a 95°C, steamer
	Bloqueio das ligações inespecíficas	Banho-Maria (60°C) por 1 hora com leite quente 5%
	Bloqueio da Peroxidase endógena	T. ambiente por 1 hora com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% em local escuro.
	Lavagem	TBS pH 7,6
	Anticorpo Primário	1:200
<b>LOXL2</b>	Recuperação antigênica	Tampão Citrato pH 6,0, 25 minutos a 95°C, steamer
	Bloqueio das ligações inespecíficas	Leite de cabra por 15min
	Bloqueio da Peroxidase endógena	T. ambiente por 1 hora com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% em local escuro.
	Lavagem	TBST pH 7,6
	Anticorpo Primário	1:500
<b>HIF1A</b>	Recuperação antigênica	EDTA pH8 na panela de pressão por 3 minutos
	Bloqueio da Peroxidase endógena	T. ambiente por 1 hora com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% em local escuro.
	Lavagem	PBS
	Anticorpo Primário	1:200

Para detecção foi adicionado cromógeno DAB e observada a revelação por cerca de 30 segundos, interrompendo a reação com água destilada. Seguido por coloração com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, desidratação e montagem.

#### 4.6. Quantificação das reações

Para cada marcador estudado, foram obtidas 5 imagens não-sobrepostas à objetiva de 40x, em campos aleatórios, sendo uma central ao tumor e as demais ao redor da primeira, a cada 45°. As imagens foram obtidas de áreas intratumorais, evitando regiões de necrose. Uma segunda metodologia para obtenção das imagens também foi adotada, com 5 campos à objetiva de 40x em áreas de alta marcação (“*hot spots*”).

Cada imagem foi avaliada histologicamente de acordo com: a localização da marcação, se em matriz extracelular e/ou citoplasmática e/ou nuclear; presença ou ausência de marcação em células epiteliais; intensidade da coloração (0 = negativo; 1 = fraca; 2 = forte); e porcentagem de células epiteliais marcadas (0 = negativo; 1 = 0 a 25%; 2 = 25 a 50%; 3 = 50 a 75%; e 4 = 75 a 100%). As análises das células epiteliais foram condensadas por meio da somatória dos escores, sendo consideradas as pontuações de 0 a 3 para “baixa expressão” e de 4 a 6 para “alta expressão”, portanto, analisando as características de forma conjunta (STREFEZZI et al., 2012).

Devido à grande variação de tipos histológicos em tumores mamários, bem como o número amostral reduzido para certos subtipos, optou-se por agrupar os casos em grupos histológicos de “Baixa Malignidade” (carcinoma e mioepitelioma maligno, carcinomas papilar, tubulopapilar, misto e complexo) e “Alta Malignidade” (carcinomas sólido, cribriforme, micropapilar e comedocarcinoma) (RASOTTO et al., 2017).

#### 4.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados por meio do teste de Mann-Whitney ou Chi-quadrado, dependendo do tipo de dado analisado. A sobrevida pós-cirúrgica foi analisada pelo método de Kaplan-Meier seguido do teste de Mantel-Cox (*logrank*). A correlação entre parâmetros foi avaliada com o teste de Spearman. Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism® (versão 9.5.1 para macOS, GraphPad software, Inc.) e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Casuística

Foram analisadas 95 amostras de carcinomas mamários de 91 cadelas. O subtipo mais frequente foi o carcinoma tubulopapilar (33/95, 34,7%), seguido por carcinoma complexo (21/95, 22,1%). Os diagnósticos estão apresentados na Tabela 10:

**Tabela 10:** Número de casos para cada subtipo de carcinoma mamário canino incluído no estudo e sua respectiva porcentagem.

<b>Tipo histológico</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Carcinoma tubulopapilar	33	34,7
Carcinoma complexo	21	22,1
Carcinoma em tumor misto	14	14,7
Carcinoma tubular	11	11,6
Carcinoma sólido	6	6,3
Carcinoma cribriforme	2	2,1
Carcinoma e mioepitelioma maligno	2	2,1
Carcinoma papilar	2	2,1
Comedocarcinoma	2	2,1
Carcinoma <i>in situ</i>	1	1,1
Carcinoma micropapilar	1	1,1
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>100,0</b>

A média de idade no momento do diagnóstico foi de 10,5 anos, variando entre 5 e 17. Dezenove raças foram representadas nesse estudo, dentre as quais, Poodle foi a mais frequente, representando 8,8% (8/91) da casuística total e 32 animais não possuíam raça definida (35,2%). As raças incluídas no estudo e sua proporção na casuística total estão representadas na Tabela 11.

Em 24,1% (22/91) dos casos, a morte foi atribuída ao tumor enquanto 21,9% (20/91) vieram a óbito por causas não relacionadas ao neoplasma. Em 18,6% (17/91) dos casos, a causa da morte era desconhecida e, ao final do período do estudo, 48,3% (44/91) dos animais permaneciam vivos.

**Tabela 11:** Número de animais representados no estudo de acordo com suas raças.

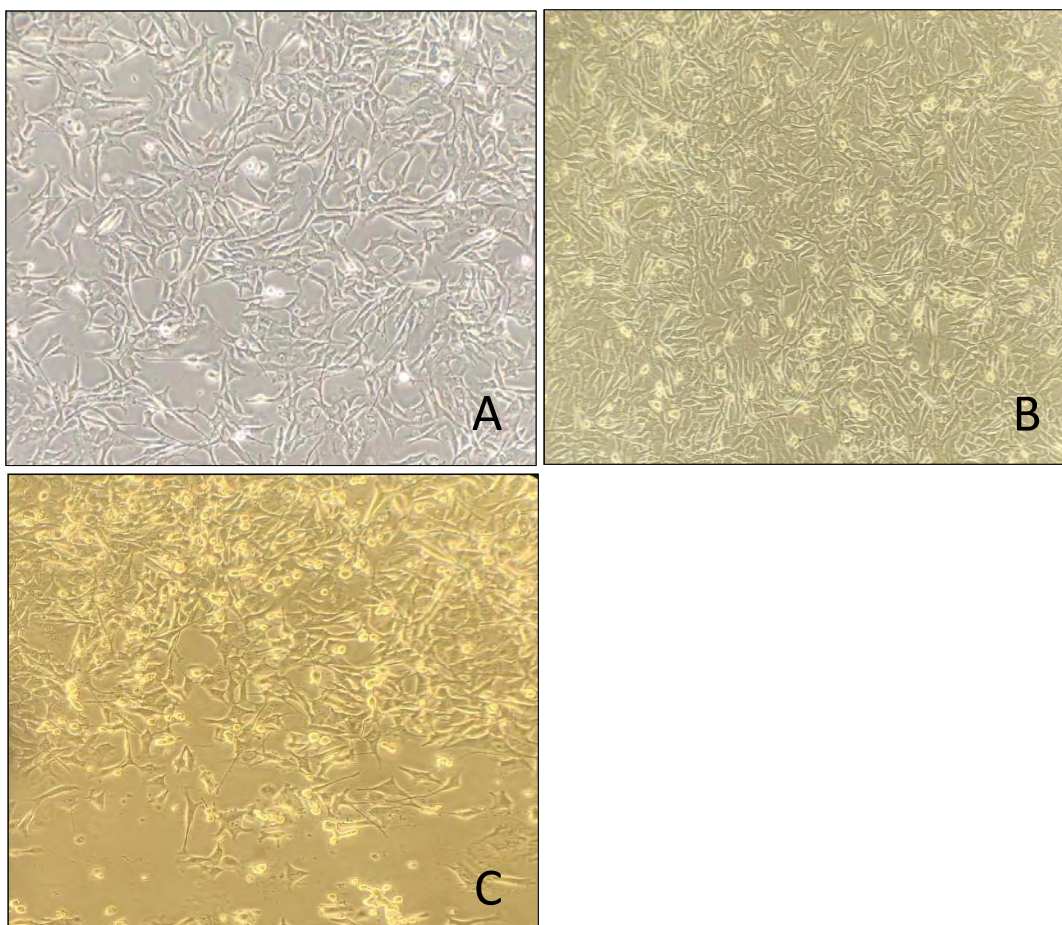
<b>Raça</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
SRD	32	35,2
Poodle	9	9,9
Pinscher miniatura	8	8,8
Dachshund	6	6,6
Fox paulistinha	5	5,5
Yorkshire	5	5,5
Shih Tzu	4	4,4
Border Collie	4	4,4
American Pit Bull	3	3,3
Golden Retriever	2	2,2
Lhasa Apso	2	2,2
Boxer	2	2,2
Cocker Spaniel	2	2,2
Labrador	2	2,2
Beagle	1	1,1
Doberman	1	1,1
Maltês	1	1,1
Pastor Alemão	1	1,1
Pastor Belga	1	1,1
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>100</b>

## 5.2. Cultivo celular

Os experimentos de cultivo celular foram adicionados ao projeto inicial com o objetivo de investigar a interação entre LOX e HIF1A, bem como os efeitos que as variações dos níveis de O<sub>2</sub> podem causar na expressão dessas proteínas. A etapa *in vitro* desse estudo consistiu do cultivo de linhagens celulares de carcinomas mamários e ensaios de proliferação celular, de migração celular (*scratch assay*), e WB para quantificação das proteínas expressas.

Microscopicamente, todas as linhagens celulares utilizadas eram fusiformes. CIPp e CIPm apresentaram vacúolos em seu citoplasma (Fig. 2).

**Figura 2**– Linhagens celulares utilizadas



**Fonte:** Arquivo pessoal

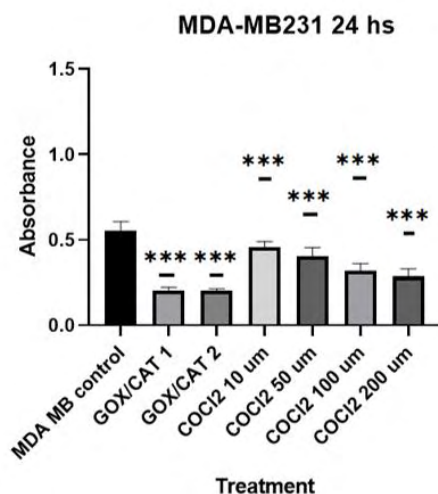
**Legenda:** Fotomicrografia de cultivo celular com as linhagens: (A) CIPp, células fusiformes com aproximadamente 80% de confluência; (B) CIPm, células fusiformes apresentando total confluência; (C) MDA-MB-231, apresentando baixa confluência, presença de células puntiformes e debris celulares. Objetiva de 40x.

### 5.2.1. Ensaio de Proliferação Celular

O ensaio de Proliferação celular demonstrou que, nas primeiras 24 horas subsequentes à aplicação dos tratamentos, todas as linhagens celulares analisadas, com exceção da linhagem CIPm, manifestaram uma redução significativa da proliferação celular (Figs. 3 e 4). Em virtude desses achados, o ensaio de migração celular foi exclusivamente conduzido com a linhagem celular de característica metastática.



**Figura 3** – Proliferação celular relativa da linhagem MDA-MB231 após 24 horas de hipóxia



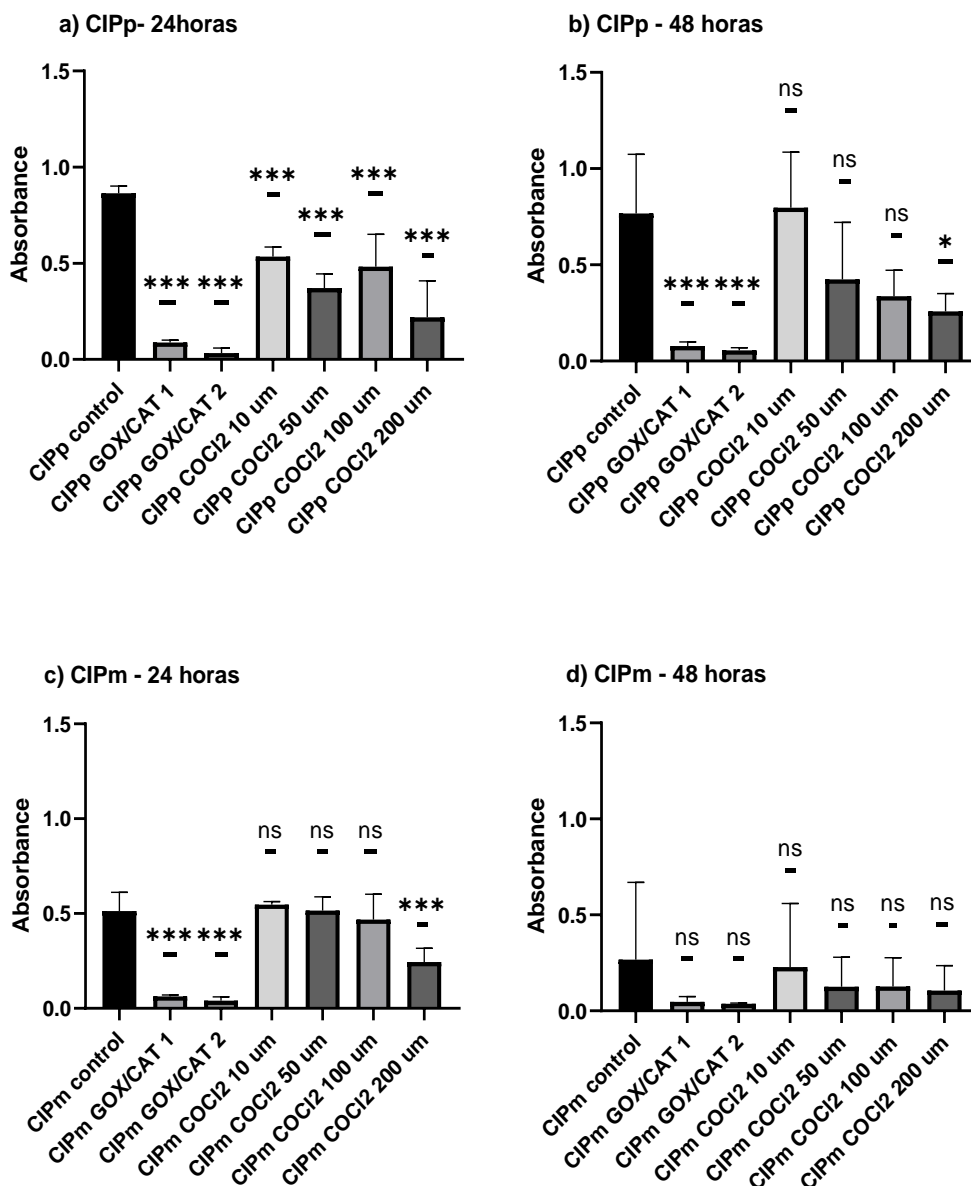
ns (not significant); \* (p <0.05); \*\* (p <0.01); \*\*\* (p <0.001)

**Legenda:** Gráfico da comparação entre as taxas de proliferação celular de MDA-MB após 24 horas de hipóxia com diferentes tratamentos (p<0,0001;  $\chi^2=0,9337$ ).

Os dados resultantes desta pesquisa sugerem que as linhagens celulares CIPp, CIPm e MDA-MB231 demonstraram uma taxa superior de proliferação celular sob condições de hipóxia, sem induzir eventos citotóxicos. Tais observações corroboram as observações de Rana, Singh e Koch (2019). Estes autores postularam que a hipóxia provocada por  $\text{CoCl}_2$  conduz ao acúmulo da proteína HIF1A, impactando diretamente na expressão genética associada ao estado hipóxico, com implicações na angiogênese e processos apoptóticos.

Este dano é expresso pela diminuição da taxa de proliferação celular principalmente. No entanto, após 48 horas de tratamento, os efeitos desses reagentes diminuíram, permitindo o retorno às taxas iniciais de proliferação. Comparando as linhagens celulares primárias e metastáticas, observamos que as linhagens metastáticas apresentaram menores efeitos. GOX/CAT causou a morte de, praticamente, 100% das células em ambas as concentrações testadas, as quais foram escolhidas de acordo com a indicação do fabricante. Em relação aos tratamentos aplicados, todas as concentrações de  $\text{CoCl}_2$  causaram uma diminuição na taxa de proliferação, mas a concentração de 200  $\mu\text{M}$  induziu danos intensos nas células, portanto, foi excluída para os próximos testes.

**Figura 4-** Proliferação celular relativa das linhagens CIPp e CIPm após 24 horas e 48 horas de hipóxia



ns (not significant); \* ( $p < 0.05$ ); \*\* ( $p < 0.01$ ); \*\*\* ( $p < 0.001$ )

**Legenda:** Gráficos demonstrando a comparação entre as taxas de proliferação celular de: (a) CIPp após 24h de hipóxia ( $p < 0,0001$ ; chi-quadrado=0,9101) (b) CIPp após 48h de hipóxia ( $p=0,0020$ ; chi quadrado=0,7336); (c) CIPm após 24h de hipóxia ( $p < 0,0001$ ; chi quadrado=0,9192); (d) CIPm após 48h de hipóxia ( $p=0,8235$ ; chi quadrado=0,1659).

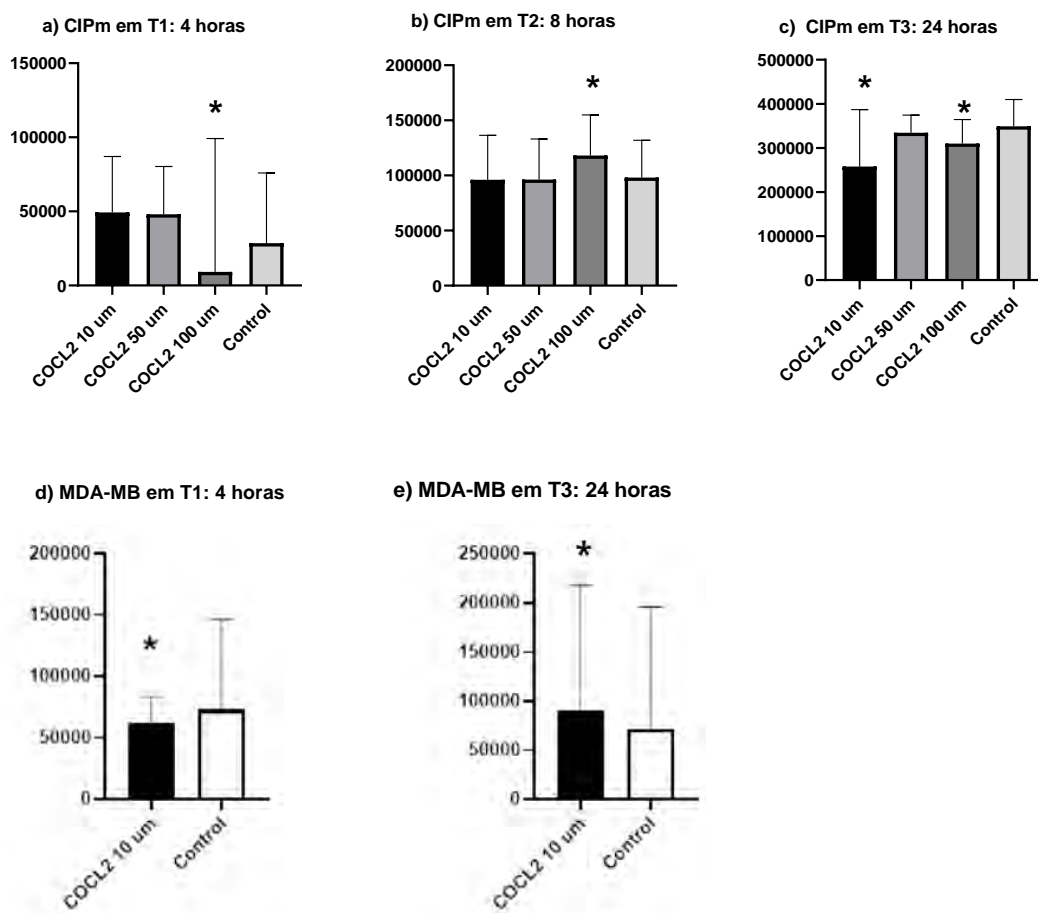
Para o teste de proliferação celular, o ensaio MTS foi usado, o qual demonstrou que todas as concentrações testadas de GOX/CAT geraram a morte de aproximadamente 100% das células. O ensaio MTS avalia o metabolismo celular, enquanto a GOX/CAT interfere no mesmo ponto do metabolismo, gerando interferência nessa quantificação. Como o único teste disponível para medir a proliferação celular era o MTS, conclui-se que o método mais apropriado nessas condições seria a indução de hipóxia com cloreto de cobalto, excluindo a catalase/glucose oxidase dos próximos experimentos.

O teste de proliferação celular realizado com a linhagem celular MDA-MB-231 revelou que apenas a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de cloreto de cobalto não apresentou alta toxicidade, sendo essa a única concentração desse reagente escolhida para o ensaio de migração celular.

### **5.2.2. Ensaio de migração celular**

A concentração de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  causou diminuição significativa na migração celular em CIPm em comparação com o grupo controle ( $p=0,0145$ ). Esse fato foi observado em T1 (4 horas após o tratamento), pico de eficácia do tratamento. As concentrações de 10 ( $p=0,0082$ ) e 50  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0098$ ) de  $\text{CoCl}_2$  também diminuiram a migração celular em T1 (Fig. 5). Oito horas após o tratamento (T2), a migração das células tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  ( $p=0,0080$ ) mostrou um aumento significativo em comparação com o grupo controle, alcançando taxas de migração próximas às das outras concentrações de  $\text{CoCl}_2$ , em concordância com Semenza (2003), que concluiu que a hipóxia facilita a migração celular. Considerando a hipótese de que a hipóxia pode selecionar células com comportamento migratório mais agressivo, nota-se que em T3, o tratamento com as células que migraram mais lentamente foi realizado com 10  $\mu\text{M}$  ( $p=0,0162$ ) de  $\text{CoCl}_2$ , ou seja, a concentração mais baixa foi aquela com menor migração em T1.

**Figura 5**– Representação da migração de CIPm e MDA-MB231 sob diferentes concentrações de  $\text{CoCl}_2$ .



**Legenda:** Gráficos demonstrando a migração celular em diferentes tempos: (a)T1: CIPm 4 horas após indução de hipóxia; (b) T2: CIPm 8 horas após indução de hipóxia; (c) T3: CIPm 24 horas após indução de hipóxia; (d) T1:MDA-MB 4 horas após indução de hipóxia; (e)T3:MDA-MB 24 horas após indução de hipóxia.

A maior dificuldade encontrada neste experimento foi diferenciar qual efeito é devido à hipóxia e qual efeito é devido à citotoxicidade do cloreto de cobalto. Uma câmara de hipóxia não estava disponível para os experimentos, então procuramos por reagentes que pudessem mimetizar o ambiente hipóxico.

O teste de proliferação celular buscou reduzir o viés dessa citotoxicidade, encontrando a concentração que causou menos danos às células, no entanto, não foi possível mensurar a real hipóxia causada nesse meio diante das concentrações utilizadas.

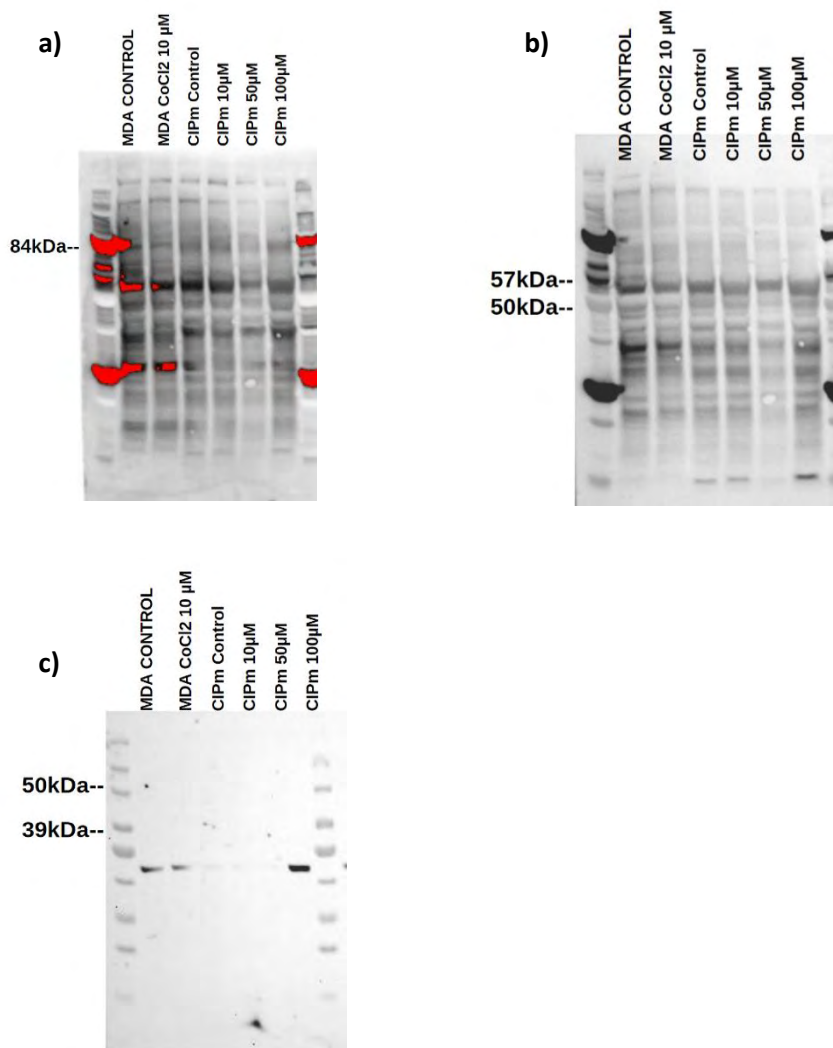
### 5.2.3. Quantificação de LOX e HIF1A em células expostas a condições de hipóxia e normóxia

A marcação encontrada na análise Western blotting foi inespecífica, e apesar de as bandas mais fortemente marcadas se encontrarem na altura dos pesos moleculares esperados, o fundo da imagem ainda se encontrou presente (Fig. 6).

LOX possui diferentes pesos moleculares dependendo do seu estágio de maturação (SMITH et al., 2016). Quando a proteína está em sua forma "imatura", recém-saída do retículo endoplasmático, possui um peso molecular de aproximadamente 50 kDa. Podemos chamar essa forma "imatura" da proteína de pro-LOX. Quando a pro-LOX é secretada para o ambiente extracelular, onde desempenha sua função primária de ligação cruzada de colágeno e elastina, a proteína é clivada por metaloproteinases, como ADAMTS2 e BMP-1, e se torna ativa (ROSELL-GARCÍA et al., 2019; TENTI, VANNUCCI, 2020).

Nesse ponto, a proteína precursora pro-LOX é clivada em LOX, com aproximadamente 32 kDa e atividade enzimática, e LOX-PP, um pró-peptídeo com aproximadamente 18 kDa. Dessa forma, é possível perceber que, pelo menos no caso da proteína LOX, um WB com bandas em forma de "código de barras" é um resultado esperado (WANG et al., 2021).

A proteína beta-actina foi usada como controle da reação e carga correta, uma vez que ela é expressa em todas as células eucarióticas e não é afetada pelos tratamentos celulares. A marcação obtida para a beta-actina foi conforme esperada, na altura da banda de 47 kDa.

**Figura 6:** Análise de Western blotting

**Legenda:** (a) Padrão de marcação inespecífica para proteína LOX. Linhagens celulares CIPm e MDA-MB231 tratadas com diferentes concentrações de CoCl<sub>2</sub>; (b) Padrão de marcação inespecífica para HIF1A. Linhagens celulares CIPm e MDA-MB231 tratadas com diferentes concentrações de CoCl<sub>2</sub>, c) Controle de Beta actina para análise de Western blotting.

### 5.3. Validação do anticorpo

Por meio de WB, confirmamos a reatividade do anticorpo anti-LOX utilizado na técnica de imuno-histoquímica, já que a mesma não possuía indicação em bula para utilização em tecido de cão. Wang et al. (2021) encontraram uma marcação em padrão código de barras para a proteína LOX na análise de WB, com pesos em torno de 50 kDa. O motivo citado para esse padrão de marcação foi que todas as enzimas dessa família possuem a sequência C-terminal de aminoácidos. O epítipo alvo desse anticorpo é justamente o domínio LOX conservado, ou seja, é provável que outras proteínas dessa família marquem em menor quantidade.

Pulmão e coração são os órgãos com maior expressão dessa proteína (WANG et al., 2021), justificando a escolha desses tecidos como controle positivo. Já o baço apresenta expressão praticamente nula de LOX (WANG et al., 2021) sendo, portanto, usado como controle negativo. A Tabela 12 resume os pesos moleculares encontrados em nosso estudo, os pesos descritos em literatura e suas respectivas referências. Como a indicação de bula do anticorpo utilizado é para ratos, camundongos, humanos e primatas não-humanos, optou-se por usar amostras de camundongos (Fig. 7).

**Tabela 12-** Relação dos tecidos utilizados, pesos e referência das proteínas utilizadas para a técnica de Western Blotting.

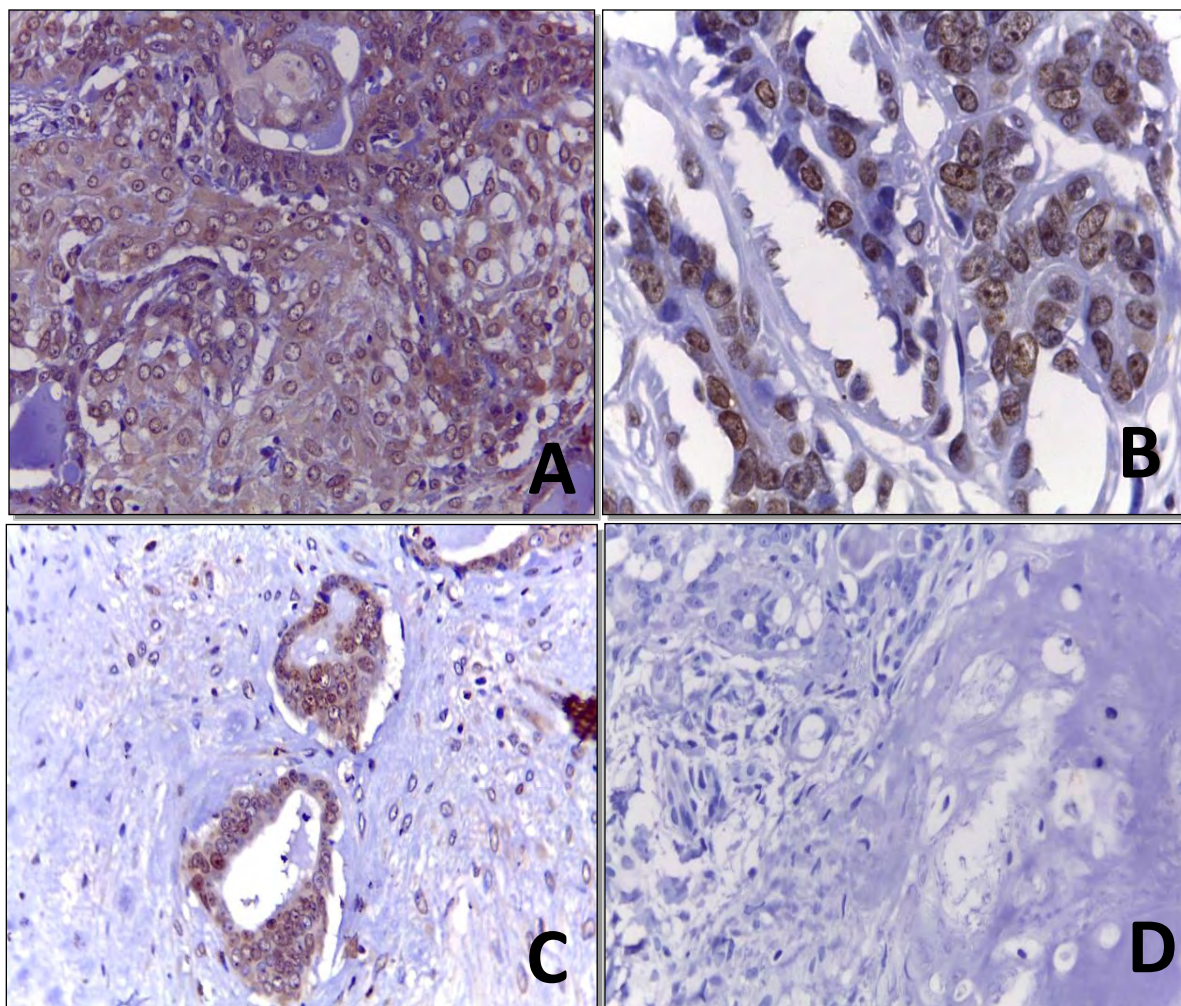
	Tecido controle	Peso esperado (Da)	Referência	Peso encontrado (KDa)
<b>LOX</b>	Coração	46.097	(CRAIGHEAD et al., 2018)	80
<b>LOXL2</b>	Fígado	87.003	(FONG; FONG; CSISZAR, 2009)	70
<b>HIF1A</b>	Rim	92.319	(KIETZMANN et al., 2001)	70

### 5.4. Imuno-histoquímica

A marcação de LOX (Fig. 3) demonstrou ser do tipo citoplasmática e/ou nuclear, tanto em tumores mamários humanos quanto em tumores mamários caninos. A família das lisil-oxidases apresenta diversas funções, porém inter-relacionadas, com localização

intracelular, intranuclear e até ligada às proteínas da MEC (MOLNAR et al., 2003b). Concordando com as informações encontradas na literatura (BARKER; COX; ERLER, 2012), nossas análises demonstraram que a localização da proteína LOX pode ser citoplasmática e/ou ligada a MEC, e/ou nuclear nas células epiteliais. Também foram observadas marcações em fibroblastos e células mioepiteliais. A técnica imunohistoquímica para detecção da proteína HIF1A demonstrou a presença da proteína em localização citoplasmática e/ou em MEC (Fig. 8).

**Figura 7** - Imunomarcacão de LOX.



**Fonte:** Arquivo pessoal

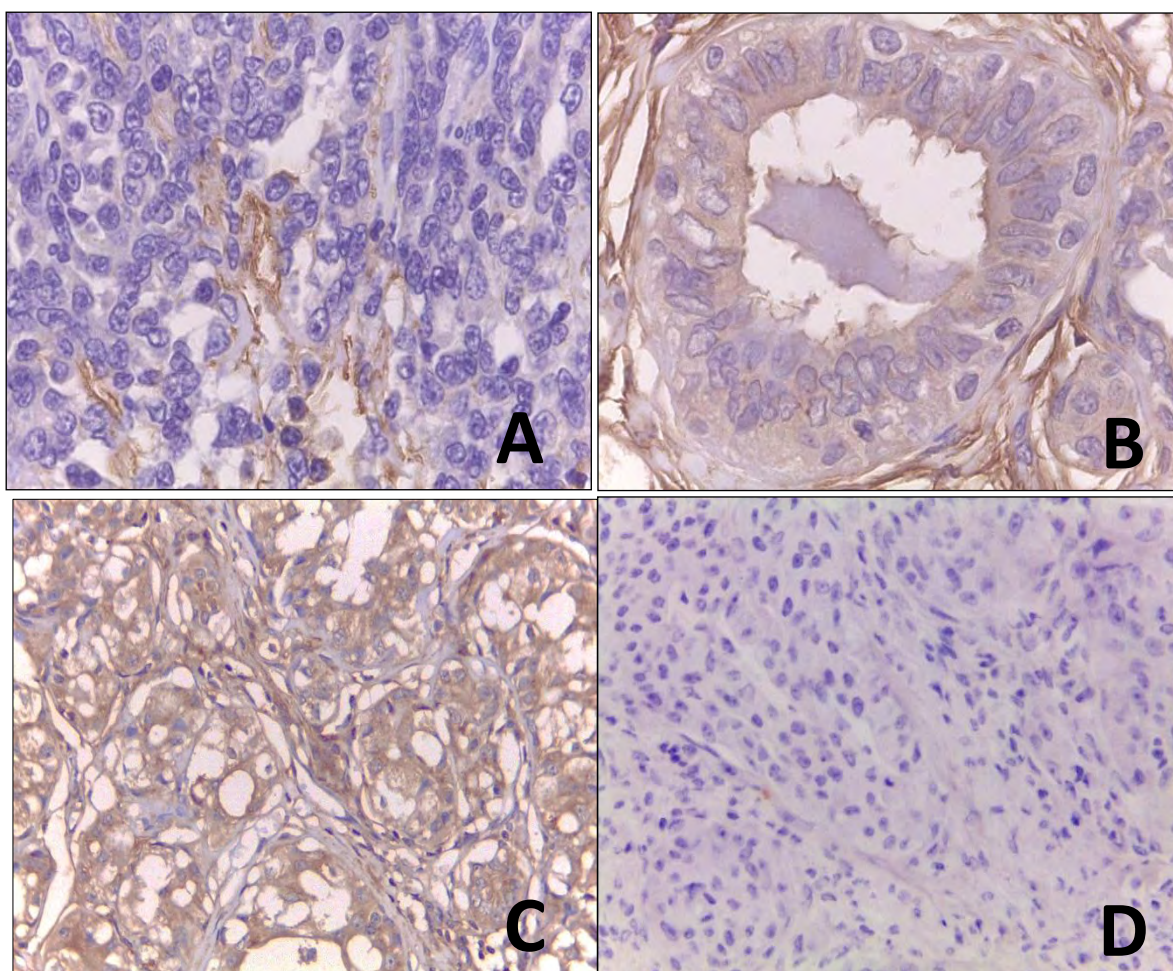
**Legenda:** Fotomicrografias de carcinomas mamários caninos apresentando imunomarcacão para LOX: (A) marcação citoplasmática de intensidade forte (Obj. 40x); (B) marcação nuclear (obj. 100x); (C) marcação de núcleo e citoplasma (Obj. 40x); (D) controle negativo (Obj. 40x). Imunohistoquímica, DAB, contra coloração com Hematóxilina de Harris.



LOXL2 foi detectada em núcleo e/ou citoplasma e/ou matriz (Fig. 5), apresentando padrão forte e finamente granular. Uyama et al. (2006) demonstraram um efeito de retroalimentação direta entre LOXL2 e HIF1A como um regulador positivo da glicólise aeróbia. LOXL2 é um gene que responde à hipóxia através da estabilização de HIF1A e da geração de peróxido de hidrogênio. Corroborando com esse estudo, ao redor de diversos focos de necrose foi possível notar um contorno de maior expressão proteica devido à hipóxia encontrada nesses locais (Fig.9).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para LOX, LOXL2 e HIF1A entre os grupos histológicos de Alta e Baixa Malignidade, quando

**Figura 8** - Imunomarcacão de HIF1A.

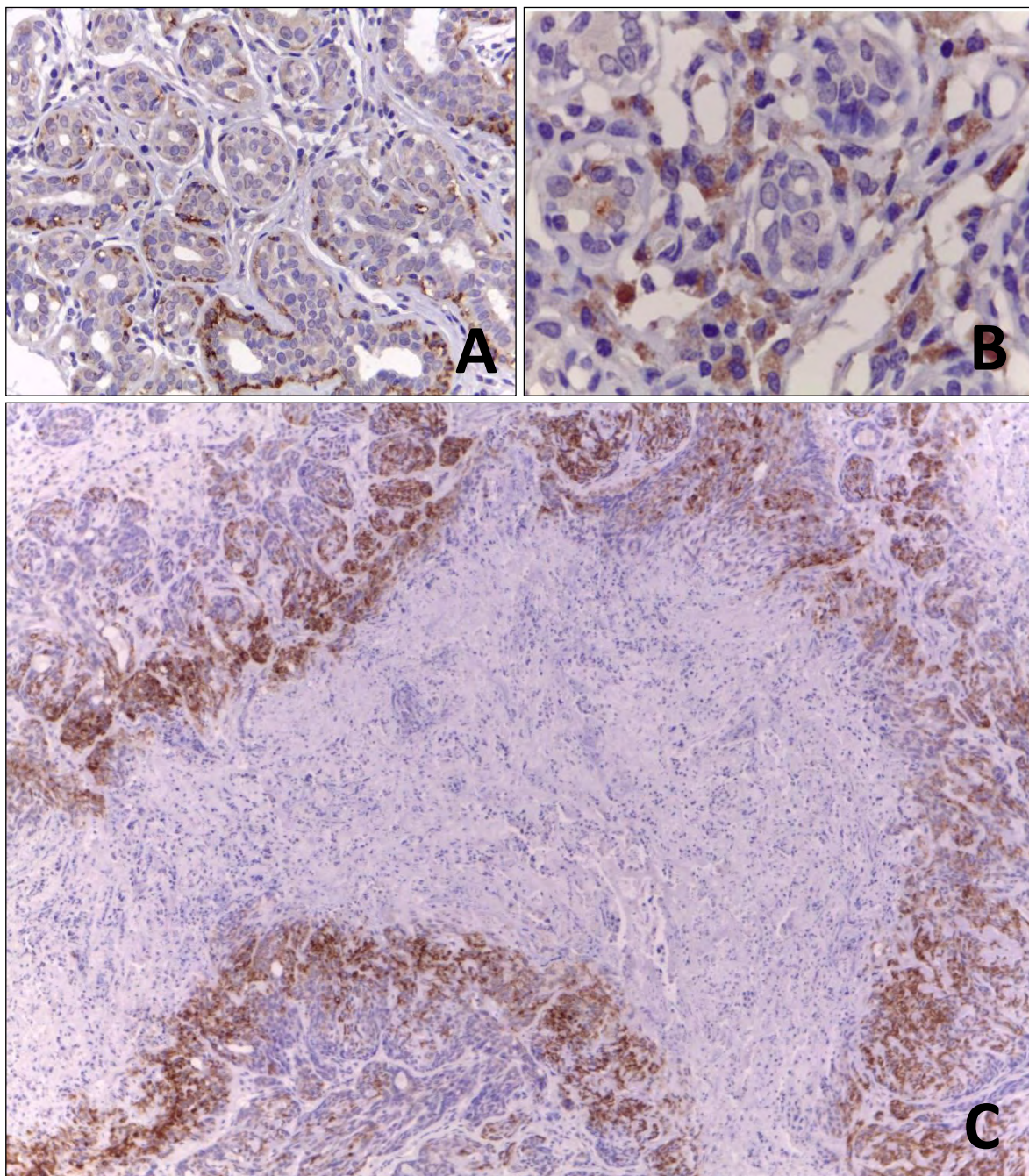


**Fonte:** Arquivo pessoal

**Legenda:** Fotomicrografias de carcinomas mamários caninos apresentando imunomarcacão para HIF1A: (A) marcação em MEC (Obj. 40x); (B) marcação citoplasmática (obj. 100x); (C) marcação de citoplasma e MEC (Obj. 40x); (D) controle negativo (Obj. 40x). Imuno-histoquímica, DAB, contra coloração com Hematoxilina de Harris.

comparadas a presença/ausência de marcação em células epiteliais, a porcentagem de células epiteliais marcadas e a intensidade de marcação (tanto individualmente como em escore somatório), assim como a presença/ausência de marcação em células

**Figura 9** - Imunomarcção de LOXL2.



**Fonte:** Arquivo pessoal

**Legenda:** Fotomicrografias de carcinomas mamários caninos apresentando imunomarcção para LOXL2: (A) marcação citoplasmática (Obj. 40x); (B) marcação citoplasmática em maior aumento (obj. 100x); (C) marcação ao redor de foco necrótico (Obj. 10x).

mioepiteliais (Tab. 13 e 14). Entretanto, observamos que apenas 1/8 (12,5%) dos tumores de Alta Malignidade apresentou fibroblastos positivos para HIF1A, contra 35/57 (61,4%) dos de Baixa Malignidade ( $p=0,0180$ ).

**Tabela 13:** Dados utilizados para análise entre grupos histológicos e a presença ou ausência de marcação em células epiteliais, porcentagem e intensidade da marcação, e presença/ausência de marcação em células mioepiteliais.

	Células epiteliais (+)	Células epiteliais (-)	Média Escore	Células mioepiteliais (-)	Células mioepiteliais (+)
<b>HIF1- A</b>	Alta: 8	Alta: 0	Alta: 4,62	Alta: 9	Alta: 1
	Baixa: 57	Baixa: 3	Baixa: 4,82	Baixa: 48	Baixa: 7
<b>LOXL2</b>	Alta: 6	Alta: 2	Alta: 3	Alta: 6	Alta: 2
	Baixa: 44	Baixa: 4	Baixa: 3,29	Baixa: 29	Baixa: 19
<b>LOX</b>	Alta: 6	Alta: 0	Alta: 5,16	Alta: 5	Alta: 1
	Baixa: 34	Baixa: 0	Baixa: 5	Baixa: 8	Baixa: 27

**Tabela 14:** Valores de p obtidos na análise entre grupos histológicos e a presença ou ausência de marcação em células epiteliais, porcentagem e intensidade da marcação, e presença/ausência de marcação em células mioepiteliais e fibroblastos.

	Células epiteliais (+/-)	Células epiteliais (%)	Células epiteliais (intensidade)	Células epiteliais (escore)	Células mioepiteliais (+/-)	Fibroblastos (+/-)
<b>HIF1- A</b>	>0,9999	0,6902	0,7091	0,5924	>0,9999	0,0180*
<b>LOXL2</b>	0,2001	0,9335	0,7504	0,9284	0,6960	>0,9999
<b>LOX</b>	-	0,7397	0,9617	>0,9999	>0,9999	>0,9999

Um estudo demonstrou que HIF1A é capaz de suprimir a proliferação de fibroblastos em casos de infarto do miocárdio (JANBANDHU et al., 2022). Chen et al. (2022) associaram uma alta expressão de LOX em fibroblastos a maior intensidade de lesões em doença aórtica de humanos. Apesar do papel regulatório existente entre LOX e HIF1A, o mecanismo pelo qual essas proteínas atuam em fibroblastos ainda não foi totalmente elucidado, assim como seus possíveis efeitos no microambiente tumoral.

A comparação entre os casos de animais que morreram em função do tumor e os casos censurados também não apresentou diferenças estatisticamente significantes em função da presença/ausência de marcação para LOX e HIF1A ( $p > 0,9999$ ), bem como para a intensidade de marcação de LOX ( $p > 0,9999$ ) e escore somatório para LOXL2 e HIF1A ( $p = 0,7266$  e  $p = 0,6949$ , respectivamente).

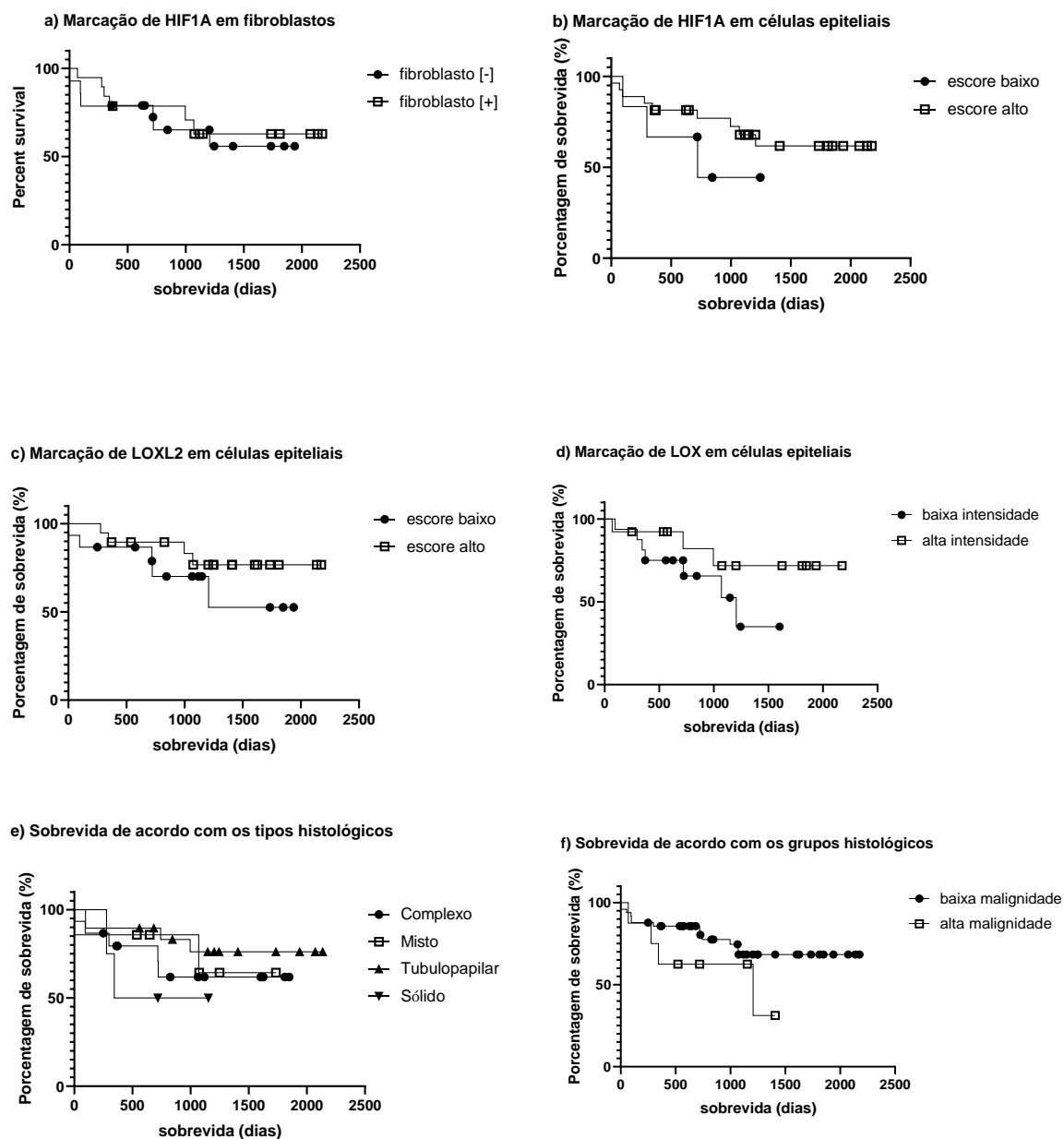
Contudo, todos os casos analisados no grupo de animais censurados (25/25, 100%) apresentaram marcação para a proteína LOXL2 em células epiteliais, enquanto 66,7% (6/9) dos casos em que o óbito foi decorrente do tumor foram positivos ( $p = 0,0140$ ), ou seja, a negatividade de células epiteliais para esta proteína está relacionada ao aumento da probabilidade de óbito em função da doença. Nossos resultados divergem dos de Wen et al. (2020), que afirmaram que, quando essas proteínas estão exercendo suas atividades no ambiente extracelular, podem atuar na remodelação da MEC, facilitando a invasão tumoral e metástase, e, portanto, causando diminuição do tempo de sobrevivência pós-cirúrgico e aumentando a probabilidade de óbito em função da doença. =A maior expressão de LOX e de LOXL2 está, geralmente, relacionada a pior prognóstico e maior malignidade em pacientes com câncer (BARKER; COX; ERLER, 2012). Entretanto, estudos relacionados à regulação dessas proteínas destacaram um papel paradoxal, revelando que elas podem atuar tanto como supressor tumoral, quanto como promotor de metástases (WEN; XU; LI, 2020). Possivelmente, esses resultados conflitantes se devem aos seus múltiplos padrões de expressão temporal e espacial, que podem conferir diferentes funções para essas proteínas. No presente estudo, todas as amostras utilizadas foram obtidas por biópsia excisional com intuito curativo, ou seja, o tempo de progressão de cada tumor no momento da coleta não pode ser controlado, nem ao menos foi possível estimá-lo com rigor, impossibilitando a análise dessa variável.

A expressão de LOX é regulada positivamente em condições de hipóxia por meio da ação da proteína HIF1A e tem a capacidade de influenciar a bioquímica e a morfologia celulares, promovendo maior habilidade de migração, invasão e resistência à apoptose, além de induzir a EMT (UMEZAKI et al., 2019). O papel de promotor de metástase sugere uma queda direta na sobrevivência desses animais, independente da massa tumoral inicial. Essas informações remetem que a análise em conjunto dos sítios metastáticos e da

massa primária seria capaz de fornecer informações mais relevantes para a investigação do papel dessas proteínas em carcinomas mamários de cadelas. Infelizmente, não foi possível analisar a correlação entre a expressão de LOX e HIF1A, devido ao pequeno número de casos em que pudemos realizar imuno-histoquímicas para ambas as proteínas e pela alta expressão de LOX observada em todos os casos testados (alta intensidade e alta porcentagem).

Também não encontramos correlação entre a expressão de LOXL2 e HIF1A ( $p=0,3760$ ;  $r=0,1384$ ). Fan et al. (2020) demonstraram que a atividade intracelular de LOXL2 é capaz de regular positivamente as vias de sinalização de HIF1A/VEGF em carcinomas hepatocelulares e esse eixo pode ser impedido pela inibição de LOXL2. Apesar das proteínas em questão compartilharem a mesma via de indução por hipóxia (LUO et al., 2022), nossos resultados não corroboram essa relação. As análises de sobrevida em relação à presença/ausência de marcação para as proteínas estudadas também não revelaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados os grupos histológicos e a presença/ausência de marcação em fibroblastos. Ainda, a análise de sobrevida comparando os diferentes subtipos histológicos e grupos histológicos de Alta e Baixa malignidade também não foi estatisticamente significativa (Fig. 10).

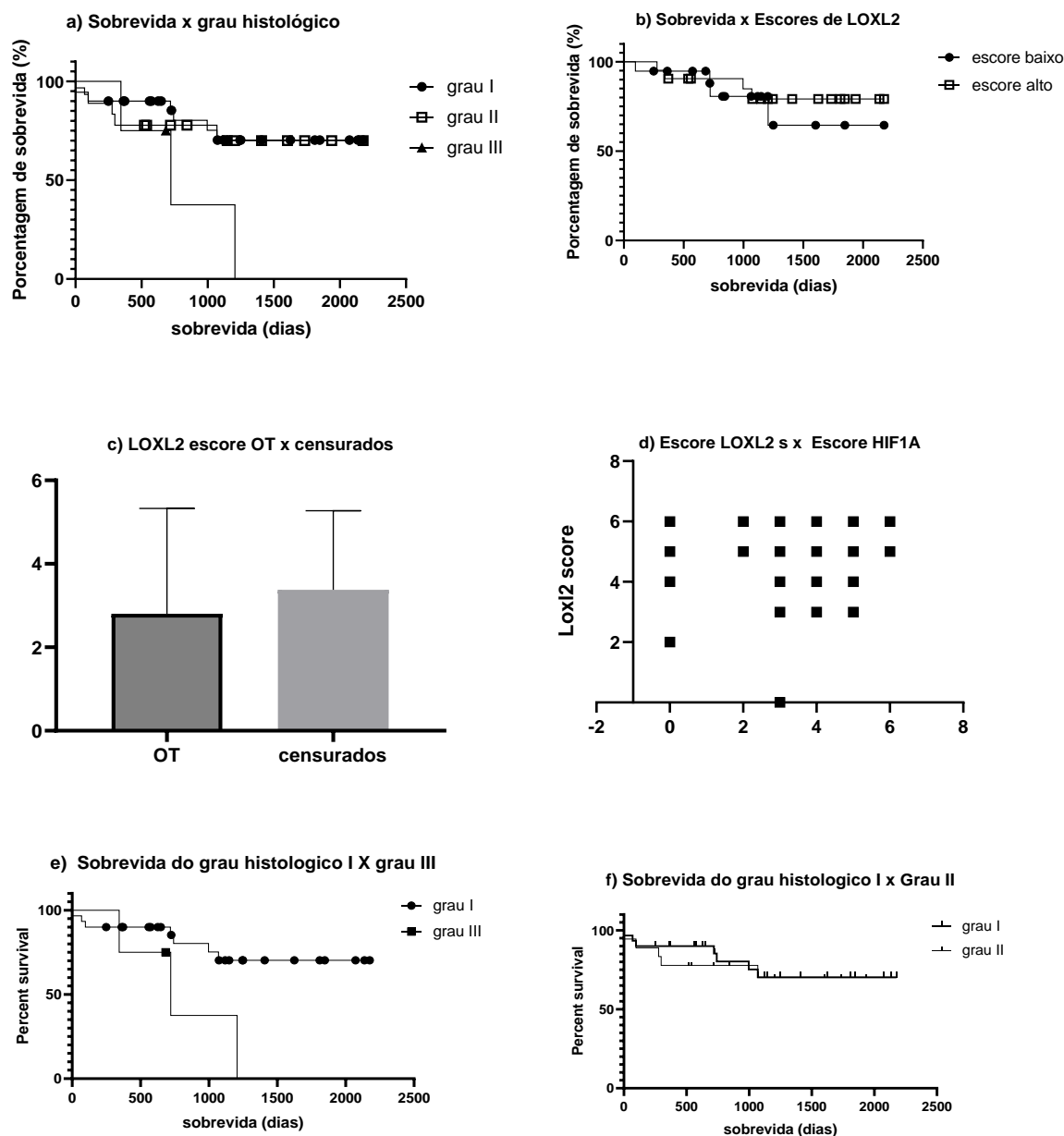
**Figura 10:** Gráficos de sobrevida e comparação pelo método aleatório



**Legenda:** Gráficos de sobrevida apresentando as comparações entre: (a) presença e ausência de fibroblastos marcados para HIF1A ( $p=0,8673$ ;  $\chi^2=0,02792$ ); (b) escores de marcação em células epiteliais para HIF1A ( $p=0,3227$ ;  $\chi^2=0,9780$ ); (c) escores de marcação em células epiteliais para LOXL2 ( $p=0,2639$ ;  $\chi^2=1,248$ ); (d) escores de marcação de células epiteliais para LOX ( $p=0,3227$ ;  $\chi^2=1,672$ ); (e) tipos histológicos ( $p=0,1592$ ;  $\chi^2=2,213$ ); (f) grupos histológicos ( $p=0,5295$ ;  $\chi^2=1,982$ ; mediana de sobrevida do grupo de alta malignidade = 1206 dias).

Os resultados das análises pelo método de seleção de *hot spots* para obtenção das imagens estão demonstrados na Figura 11, os quais corroboram com os resultados obtidos através do método de campos aleatórios, ou seja, nossas análises revelaram os mesmos resultados independentemente do método de avaliação.

**Figura 11:** Gráficos de sobrevida e comparação pelo método de hotSpot



**Legenda:** Gráficos demonstrando: (a) Comparação entre sobrevida e o grau histológico, ( $p=0,1103$  e  $\chi^2=4,409$ ; mediana de sobrevida para o grau III=721 dias); (b) Comparação entre sobrevida e os escores alto e baixo da marcação para LOXL2, ( $p=0,6113$  e  $\chi^2=0,6113$ ); (c) Escore LOXL2 x OT e censurados,  $p=0,7266$ ; (d) Correlação entre escore de LOXL2 x escore de HIF1A, ( $p=0,2980$ ); (e) Sobrevida x grau histológico gl x gIII, ( $p=0,0267$ ;  $\chi^2=4,907$ ) (f) sobrevida x grau histológico gl x gII, ( $p=0,8045$ ;  $\chi^2=0,06125$ ).

Embora a proteína HIF1A esteja intimamente relacionada ao microambiente tumoral hipóxico (PEZZUTO; CARICO, 2019), não observamos correlação entre a expressão dessa proteína e a presença/ausência de necrose intratumoral ( $p= 0,1324$ ). Também não foi encontrada relação entre a presença de infiltrado inflamatório, e a expressão dessas proteínas ( $p= 0,8217$ ). Por se tratar de um ambiente altamente heterogêneo, a presença ou ausência de necrose ou infiltrado inflamatório pode não refletir diretamente os níveis de hipóxia em uma área específica do tumor. Outro ponto que deve ser analisado que pode ter interferido em nossos resultados são os mecanismos compensatórios que podem ser desenvolvidos pelo tumor e regulam as vias de produção de HIF1A independente das condições de oxigenação tecidual (PEZZUTO; CARICO, 2019).

O número de amostras reduzido em alguns subtipos histológicos nos levou ao agrupamento de subtipos de acordo com a malignidade, com intuito de viabilizar a análise estatística dos dados incluindo o maior número de amostras possível. Porém, de maneira similar a estudos anteriores (RASOTTO et al., 2017; SALAS et al., 2015), a população utilizada foi composta por um grupo de tumores de “baixa malignidade” que representa, aproximadamente, 70% da casuística total, contra apenas 30% de tumores de “alta malignidade”, o que pode ter reduzido a capacidade de detectarmos diferenças estatísticas. Um número amostral maior no grupo de tumores de alta malignidade possivelmente possibilitaria resultados mais representativos.

O mecanismo de sinalização que regula o remodelamento da MEC por células malignas ainda precisa ser totalmente elucidado. Em paralelo, também são realizados estudos buscando estratégias terapêuticas direcionadas a redução da atividade dessas enzimas (CHEN et al., 2012). LOX e LOXL2 estão envolvidos em diversos outros processos biológicos, como a migração celular, a angiogênese e a EMT. Além disso, as superexpressões de LOX e LOXL2 encontram-se intimamente relacionadas com o estabelecimento de piores prognósticos em pacientes oncológicos (XIAO; GE, 2012).



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados na avaliação imuno-histoquímica fortalecem a importância do papel das proteínas estudadas nos tumores mamários, e também chamam a atenção para resultados conflitantes e papéis paradoxais como a função supressora de tumores e ao mesmo tempo promotora de metástases, que reforçam a importância de mais estudos que elucidem os efeitos que essas proteínas podem causar.

LOX, LOXL2 e HIF1A compartilham as mesmas vias de regulação e, ao mesmo tempo, possuem papéis distintos na tumorigênese, progressão tumoral, angiogênese e metastatização. A caracterização do perfil de expressão das proteínas LOX, LOXL2 e HIF1A evidenciou variação na localização das proteínas, ou seja, núcleo e/ou matriz e/ou citoplasma, bem como na intensidade e porcentagem de células marcadas.

Os casos de óbitos relacionados ao tumor apresentaram menor positividade de LOXL2 em comparação com os casos censurados, portanto, foi possível verificar que animais com menor expressão dessa proteína possuem maior chance de morte em decorrência de carcinomas mamários. Esse resultado sugere um possível valor prognóstico em carcinomas mamários caninos, merecendo uma investigação mais detalhada e em maior número de amostras para confirmação do resultado observado.

Tumores classificados histologicamente como sendo de Alta Malignidade apresentaram menor expressão de HIF1A em fibroblastos em comparação aos tumores classificados como Baixa Malignidade. O papel dos fibroblastos no microambiente tumoral também merece investigação mais detalhada e, provavelmente, será alvo de novas pesquisas de nosso grupo.

Nossos testes preliminares *in vitro* demonstraram a influência do ambiente hipóxico nas linhagens celulares estudadas. A hipóxia induzida por  $\text{CoCl}_2$  desencadeia redução na proliferação celular inicial. A variação nas taxas de migração celular sob diferentes concentrações de  $\text{CoCl}_2$  enfatiza sua potencial influência na progressão metastática. Além disso, nossos resultados sugerem que, sob condições hipóxicas, células de linhagens metastáticas podem manifestar um comportamento migratório mais agressivo.

A oportunidade de avaliar a expressão dessas proteínas tanto *in vitro* e em amostras de tecidos forneceu a possibilidade de compreender mais profundamente os mecanismos moleculares envolvidos no microambiente tumoral de tumores mamários caninos e fornece *insights* sobre a complexidade de sua regulação e função. Os resultados também apontam para possíveis aplicações clínicas, como o uso da expressão de LOXL2 como um possível marcador prognóstico em casos de carcinomas mamários caninos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente esses processos e suas implicações clínicas.

## 7. REFERÊNCIAS

- AUMILLER, V. et al. Comparative analysis of lysyl oxidase (like) family members in pulmonary fibrosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 149, 2017.
- BAKER, A.M. et al. Lysyl Oxidase Plays a Critical Role in Endothelial Cell Stimulation to Drive Tumor Angiogenesis. **Cancer Research**, v. 73, n. 2, p. 583–594, 2013.
- BARKER, H. E.; COX, T. R.; ERLER, J. T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 8, p. 540-552, 2012.
- BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumors in context. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 1, p. 46–54, 2001.
- BOS, R. et al. Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 During Breast Carcinogenesis. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 4, p. 309–314, 2001.
- BRUNETTI, B. et al. Immunohistochemical screening of her2 in canine carcinomas: A preliminary study. **Animals**, v. 11, n. 4, p. 1006. 2021.
- CASSALI, G. Perspectives for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Mammary Neoplasms in Dogs. **36th World Small Animal Veterinary Congress**, p. 244–246, 2011.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Braz J Vet Pathol**. V. 4, n. 2, p.153-180, 2011.
- CASSALI, G. D. **PATOLOGIA MAMÁRIA CANINA - DO DIAGNÓSTICO AO TRATAMENTO**. 1. ed. São Paulo: p. 209, 2017.
- CHEN, L. C. et al. Human breast cancer cell metastasis is attenuated by lysyl oxidase inhibitors through down-regulation of focal adhesion kinase and the paxillin-signaling pathway. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 134, n. 3, p. 989–1004, 2012.
- CHEN, Y. et al. Dysregulation of interaction between LOX high fibroblast and smooth muscle cells contributes to the pathogenesis of aortic dissection. **Theranostics**, v. 12, n. 2, p. 910–928, 2022.
- CHI, J. T. et al. Gene expression programs in response to hypoxia: Cell type specificity and prognostic significance in human cancers. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 3, p. 395–409, 2006.
- CLEARY, M. P.; GROSSMANN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 2, p. 202–213, 2010.
- CSISZAR, K. Lysyl oxidases: A novel multifunctional amine oxidase family. In: **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. v. 70, p. 1–32, 2001.
- DA SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625–633, 2004.
- DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**: Roca, São Paulo: p. 371-383, 2008.

DE COSTER, R. et al. Variations de la LH, de la FSH, du 17B estradiol et de la progestérone au cours du cycle estral de la chienne. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 123, p. 177-184, 1979.

DE HEER, E. C.; JALVING, M.; HARRIS, A. L. HIFs, angiogenesis, and metabolism: Elusive enemies in breast cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 10, p. 5074–5087, 2020.

DE NARDI, A. B. et al. Prevalência De Neoplasias E Modalidades De Tratamentos Em Cães, Atendidos No Hospital Veterinário da Universidade Federal Do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15–26, 2002.

ELSTON, E. W.; ELLIS, I. O. Method for grading breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 2, p. 189–190, 1993.

FAN, Z. et al. LOXL2 upregulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling through Snail-FBP1 axis in hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 43, n. 5, p. 1641–1649, 2020.

FILIPPE, E. C.; CHITTY, J. L.; COX, T. R. Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 99, n. 2, p. 58–76, 2018.

FOLKMAN, J. What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent? **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 1, p. 4–7, 1990.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

GARDNER, H. L.; FENGER, J. M.; LONDON, C. A. Dogs as a Model for Cancer. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 199–222, 2016.

GIOVANI, T. M. **Estudo sobre a associação de OCT4 com marcadores prognósticos em neoplasias mamárias de cadelas**. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-17112016-113905/>, Acesso em: 13 fev. 2022.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GRAU-BOVÉ, X.; RUIZ-TRILLO, I.; RODRIGUEZ-PASCUAL, F. Origin and evolution of lysyl oxidases. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10568, 2015.

HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1–2, p. 111–33, 1974.

HELLEMAN, J. et al. Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 17, p. 5555–5564, 2008.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome—An inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, p. 4903, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, **Pesquisa Nacional de Saúde**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 13 fev. 2022.

INFANTINO, V. et al. Cancer Cell Metabolism in Hypoxia: Role of HIF-1 as Key Regulator and Therapeutic Target. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5703, 2021.

JANBANDHU, V. et al. Hif-1a suppresses ROS-induced proliferation of cardiac fibroblasts following myocardial infarction. **Cell Stem Cell**, v. 29, n. 2, p. 281- 297, 2022.

JANYASUPAB, M. et al. Detection of Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2), a Biomarker of Metastasis from Breast Cancers Using Human Blood Samples. **Recent Patents on Biomarkers**, v. 5, n. 2, p. 93–100, 2016.

JÄRVELÄINEN, H. et al. Extracellular matrix molecules: Potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 2, p. 198–223, 2009.

JOSELEVITCH, J.A., et al. High lysyl oxidase expression is an indicator of poor prognosis in dogs with cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**; 21(3):401-405. DOI: 10.1111/vco.12898. 2023.

KHAN, K. A.; KERBEL, R. S. Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa. **Nature Reviews Clinical Oncology Nature Publishing Group**, v.15, n. 5, p. 310-324, 2018.

KHANNA, C. et al. The dog as a cancer model. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1065, 2006.

KIM, Y. M.; KIM, E. C.; KIM, Y. The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 1, p. 145–149, 2011.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. **Tumors of the mammary gland**. 6. ed., p. 605-622, 2019.

LEVENTAL, K. R. et al. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 891–906, 2009.

LUO, F. et al. HIF-1 $\alpha$  inhibition promotes the efficacy of immune checkpoint blockade in the treatment of non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, v. 531, p. 39–56, 2022.

MARTIN, J. D.; SEANO, G.; JAIN, R. K. Normalizing Function of Tumor Vessels: Progress, Opportunities, and Challenges. **Annual Review of Physiology**. v. 81, p. 505-534, 2019.

MCGAVIN, D.; ZACHARY, J. F. **Bases da patologia veterinária**. 4<sup>o</sup> ed. Knoxville: 1476p, 2009.

MISDORP, W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. **World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2nd series**, v. 7, p. 1–59, 1999.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: PRESS, I. S. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: p. 575–606, 1999.

MOLNAR, J. et al. **Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins**. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. **Anais...Elsevier**, v. 1647, n. 1-2, p. 220-224, 2003.

MORRISON, W. B. Cancer in Dogs and Cats: **Medical and Surgical Management**. v. 61, n. 1, p. 591–598, 1988.

NARANJO, T. Á.; NOGUERA-SALVÁ, R.; GUERRERO, F. F. La matriz extracelular: Morfología, función y biotensegridad (parte I). **Revista Española de Patología**, v. 42, n. 4, p. 249–261, 2009.

OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organisation, Veterinary Public Health Unit & WHO Collaborating Center for Comparative Oncology**. p. 1–52, 1980.

PALMIERE, D. et al. Medroxyprogesterone acetate elevation of Nm23-H1 metastasis suppressor expression in hormone receptor-negative breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 9, p. 632–642, 2005.

PELETEIRO, C. et al. THE VALUE OF CYTOLOGY IN THE DIAGNOSIS OF MAMMARY TUMORS IN DOG AND CAT. **Journal of cytopathology**: Abstracts of the 35th European congress of cytopathology. **Anais...Lisboa, Portugal**: 2009.

PELETEIRO, M. C. Tumores mamários na cadela e na gata. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 509, p. 10–34, 1994.

PEÑA, L. et al. Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 1, p. 127–145, 2014.

PEREZ ALENZA, M. D. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n. 7, p. 287–291, 2000.

PEZZUTO, A.; CARICO, E. Role of HIF-1 in Cancer Progression: Novel Insights. A Review. **Current Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 343–351, 2019.

PINHO, S. S. et al. Canine tumors: A spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165–172, 2012.

PULZ, L. H. et al. Increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 correlates with improved outcome in canine cutaneous mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 2, p. 606–614, 2017.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Canine mammary tumors- New perspectives. **Proceedings of the Veterinary Sciences Congress**, p. 183- 190, 2002.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; & HOUSTON, D. M. Exame clínico das glândulas mamárias. Em: GUANABARA KOOGAN (Ed.). **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária**. 1ª ed. Rio de Janeiro: p. 572–578, 2002.

RASKIN, R.; MEYER, D. **Canine and Feline Cytology: A Color Atlas and Interpretation Guide**. p. 274–282, 2010.

- RASOTTO, R. et al. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 571–578, 2017.
- SALAS, Y. et al. Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.
- SALEEM, A. et al. Analysis of lysyl oxidase as a marker for diagnosis of canine mammary tumors. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 5, p. 4909–4919, 2019.
- SCHAEFER, L.; SCHAEFER, R. M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 237–246, 2010.
- SCHIETKE, R. et al. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in Hypoxia: Insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6658–6669, 2010.
- SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721–732, 2003.
- SEMENZA, G. L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 12–16, 2009.
- SEMENZA, G. L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3664–3671, 2013.
- SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. Barueri. São Paulo: Manole: 2007.
- SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573–596, 2003.
- STREFEZZI, D. R. F. et al. The Value of Immunohistochemical Expression of BAX in Formulating a Prognosis for Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 146, n. 4, p. 314–319, 2012.
- STRICKAERT, A. et al. Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. **Oncogene Nature Publishing Group**, v. 36, n. 19, p. 2637-2642, 2017.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.
- THOMAS, E.; BERNER, G. Prognostic and predictive implications of HER2 status for breast cancer patients. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 4, n. 1, p. 10–17, 2000.
- UMEZAKI, N. et al. Lysyl oxidase induces epithelial-mesenchymal transition and predicts intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, v. 110, n. 6, p. 2033–2043, 2019.

- UYAMA, R. et al. Establishment of four pairs of canine mammary tumour cell lines derived from primary and metastatic origin and their E-cadherin expression. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 4, n. 2, p. 104–113, 2006.
- VEER, L. J. VAN et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 345, p. 531–536, 2002.
- WANG, H. et al. An in-situ activity assay for lysyl oxidases. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 840, 2021.
- WEIHERMANN, A. C. et al. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 3, p. 241–247, 2017.
- WEN, B.; XU, L. Y.; LI, E. M. LOXL2 in cancer: regulation, downstream effectors and novel roles. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**: Elsevier, v.1874, n. 2, p. 188435, 2020.
- WITHROW, S. J. et al. **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: p. 619-636, 2007.
- WONG, C. C. L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 39, p. 16369–16374, 2011.
- WU, L.; ZHU, Y. The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, n. 5, p. 1200–1204, 2015.
- WU, M. et al. Repression of BCL2 by the tumor suppressor activity of the lysyl oxidase propeptide inhibits transformed phenotype of lung and pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6278–6285, 2007.
- XIAO, Q.; GE, G. Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. **Cancer Microenvironment**, v. 5, n. 3, p. 261–273, 2012.
- ZAPULLI, V. et al. **Animals, Surgical Pathology of Tumors of Domestic**: Davis-Thompson DVM Foundation, 270p., 2019.
- ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina estudo comparativo. **Arquivo de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 193–202, 2008.