

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EXPRESSÃO DE BAX E BCL-XL EM CARCINOMA TÚBULO-PAPILAR DE CADELAS

Tamires de Almeida Angelos, Ingrid Gonçalves Guimarães, Ludmila Pereira Bastos, Paula da Rocha Oliveira, Jacyelli Sgranci Angelos, Leonardo Oliveira Trivilin.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema, Campus de Alegre - 29500-000 - Alegre-ES, Brasil, tamiressangelos@gmail.com, ingridgoncalvesgg@gmail.com, ludmilap97@gmail.com, paulinha.ro94@gmail.com, jacysgranci@gmail.com, leotrivilin@gmail.com

Resumo

As neoplasias mamárias caninas frequentemente acometem as cadelas e suas semelhanças com o câncer de mama humano remetem a busca de melhorias terapêuticas que abrangem ambas espécies. A inibição da apoptose configura um dos fatores de desenvolvimento e progressão tumoral, dessa forma, a desregulação das proteínas da família BCL-2, como Bax e Bcl-XL, podem propiciar ao câncer. Assim, objetivou-se estudar, por meio da imunohistoquímica, a expressão das proteínas relacionadas à apoptose, como Bax e Bcl-XL, em carcinoma túbulo-papilar de neoplasias mamárias caninas. Obteve-se oito amostras de carcinoma túbulo-papilar diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal do HOVET-UFES, as quais foram submetidas a imunohistoquímica utilizando os anticorpos anti-BAX e anti-BCL-XL. Das amostras estudadas, 62,5% foram categorizadas como positivo e 37,5% como fraco positivo para Bax, enquanto para Bcl-XL foram 75% positivo e 25% fraco positivo. Conclui-se que em carcinoma túbulo-papilar há expressão de Bax e Bcl-XL predominantemente no escore positivo, podendo ser utilizado experimentalmente em terapias direcionadas à apoptose para regressão tumoral.

Palavras-chave: Câncer. Cadelas. Proteínas. Tumor maligno.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas- Imunologia.

Introdução

As neoplasias mamárias caninas correspondem a uma das doenças que mais acometem cadelas na medicina veterinária (VILHENA *et al.*, 2019) e também apresentam grande frequência na medicina humana. Devido a vários fatores clínicos e patológicos semelhantes ao câncer de mama humano, estudos acerca da oncologia comparativa vem crescendo com o decorrer dos anos (SCHIFFMAN; BREEN, 2015). Alguns fatores podem propiciar o desenvolvimento da doença em cadelas, como idade, hormônios e até mesmo o *status* e tempo de castração (CANADAS SOUZA *et al.*, 2019; VILHENA *et al.*, 2019; BURRAI *et al.*, 2020).

Naturalmente, proteínas da família BCL-2 (*B Cell Lymphoma 2*) atuam na regulação e execução da morte celular programada de forma intrínseca (CZABOTAR *et al.*, 2014; ZAMAN *et al.*, 2014; PAWLAK; HENKLEWSKA, 2020). As desregulações das proteínas da família BCL-2, que incluem proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas, demonstram papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral (YILDIRIM *et al.*, 2014). A proteína Bax atua de forma pró-apoptótica enquanto a proteína Bcl-XL atua de forma anti-apoptótica, por meio do sequestro de ativadores BH3 de Bax e Bak inibindo a apoptose e levando a sobrevivência celular (SHARIFI *et al.*, 2015; PAWLAK; HENKLEWSKA, 2020).

Devido a sua alta presença em tecidos neoplásicos, alguns estudos estão sendo desenvolvidos a fim de validar proteínas reguladoras da apoptose como marcadores tumorais (Dolka *et al.*, 2016). Alguns fármacos que induzem a apoptose em processos tumorais vêm sendo desenvolvidos e testados a fim de desenvolver terapias direcionadas e menos invasivas que consigam controlar ou até mesmo erradicar os tumores, visto que um dos fatores para o desenvolvimento neoplásico é a ausência da morte celular programada (PETER *et al.*, 2014; BAKIREL *et al.*, 2016).

Dessa forma, entende-se que a apoptose inibida pode atuar no desenvolvimento e crescimento neoplásico em neoplasias mamárias caninas. Além disso, há poucos estudos que envolvem a expressão de ambas proteínas Bax e Bcl-XL em neoplasias mamárias malignas caninas com foco em

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

tipos histológicos específicos como carcinoma túbulo-papilar. Assim, se faz importante acrescentar informações que contribuam e ajudem a promover melhores estratégias para o tratamento dessa doença. Dessa forma, objetivou-se estudar, por meio da imunohistoquímica, o comportamento das proteínas relacionadas à apoptose, como Bax e BCL-_{xL}, em carcinoma túbulo-papilar de cadelas.

Metodologia

Foram utilizadas oito amostras de diferentes animais acometido por neoplasias mamárias malignas de cadelas encaminhados para exame histopatológico no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, durante o período de 2015 a 2022. Este material inclui amostras provenientes da rotina de diagnóstico do Hospital Veterinário (HOVET), bem como aquelas enviadas por clínicas particulares e profissionais autônomos.

Após o levantamento dos casos nos livros de registro, foram selecionadas as amostras correspondentes ao tipo histológico carcinoma túbulo-papilar. Após separados os materiais emblocados em parafina, prosseguiu-se para a confecção de lâminas silanizadas contendo cortes histológicos de 3 µm, as quais foram utilizadas para a técnica de imunohistoquímica.

Os cortes embebidos em parafina passaram pela montagem de lâminas silanizadas. Cortes de 3 µm foram confeccionados e logo, desparafinados em xileno e re-hidratados por meio de uma série de banhos em álcoois graduados. Em seguida os cortes foram lavados com água destilada e sujeitos a recuperação antigênica com citrato de sódio pH 6,0 a uma temperatura elevada durante 15 minutos. Sequencialmente, as lâminas foram lavadas em 1x TRIS e as peroxidases endógenas foram bloqueadas com peróxido de hidrogênio a 30% em álcool metílico, na proporção 2:1 durante 40 minutos a 25° C.

Quatro banhos de 5 minutos cada em 1x TRIS deram sequência a técnica, e as lâminas foram incubadas em solução de bloqueio de proteínas inespecíficas (10 gramas de leite em pó diluído em 200 ml de TRIS) durante 60 minutos a 25 °C e posteriormente foi feito a lavagem em 1x TRIS por quatro vezes de 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas sobre as lâminas experimentais os anticorpos Bax (sc-7480, Santa Cruz Biotechnology) e Bcl-xl (sc-8392, Santa Cruz Biotechnology) com diluição padronizada a 1:100, com exceção da lâmina controle (com ausência de anticorpo primário), que permaneceu *overnight*.

Depois de três banhos de 5 minutos em 1x TRIS, as lâminas foram incubadas com o sistema de detecção o (N- Histofine– Simple Stain Rat Max PO, 414191F, NICHIREI®) a 25°C durante 30 minutos. Após três lavagens com 1x TRIS, a coloração foi visualizada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO) com diluição a 1:50, por 5 minutos. As lâminas passaram por quatro banhos de 2 minutos com água destilada. Todas as lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Harris durante 5 minutos, desidratadas em etanol, limpas em xileno e montadas com Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica em objetiva de 20x onde foram obtidas cinco fotomicrografias de campos aleatórios, de cada amostra, que posteriormente foram analisadas no software Image J utilizando o plugin IHC Profiler que realiza uma análise pixel a pixel de uma imagem IHC digital e ainda atribui uma pontuação em um sistema de quatro camadas (P <0,0001, CI = 95%). Assim, obteve-se os escores (positivo, fraco positivo e negativo) e a porcentagem de marcação dessas proteínas no citoplasma.

Resultados

A Tabela 1 resume os achados de categorização de expressão das proteínas Bax e Bcl-_{xL} em oito amostras de carcinoma túbulo-papilar de cadelas, e a Figura 1 evidencia o padrão de expressão nesse tipo histológico sendo ambas proteínas expressas de forma positiva.

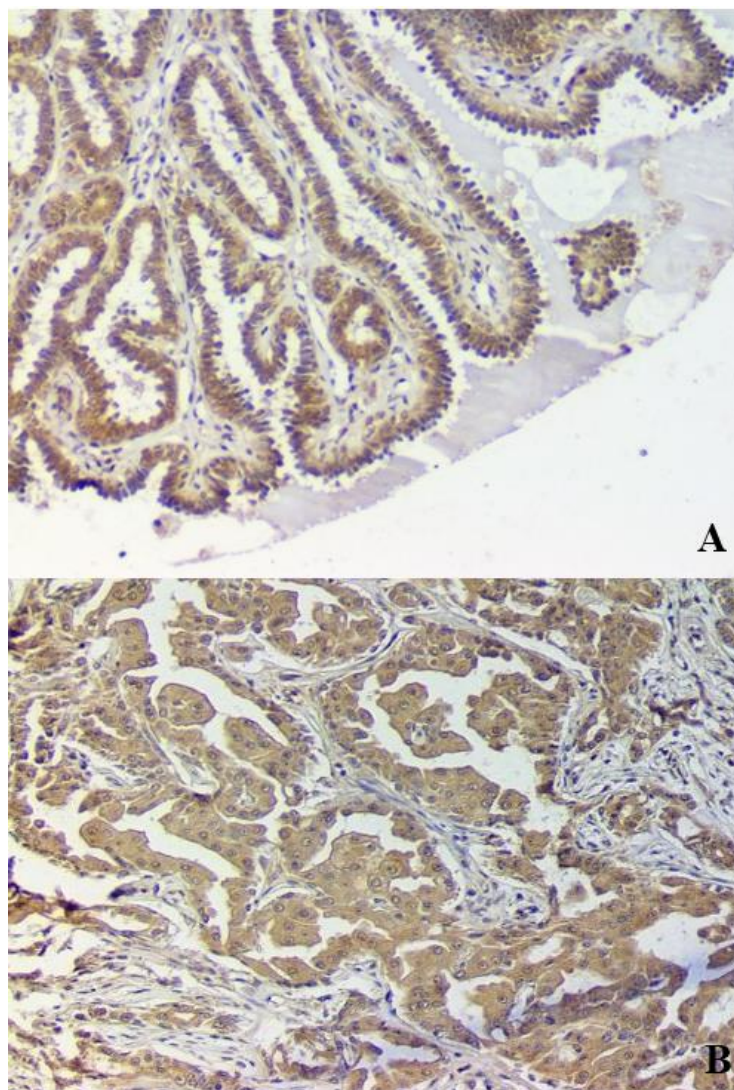
A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Tabela 1 - Frequência dos escores de categorização para as proteínas Bax e Bcl-x_L em carcinoma túbulo-papilar em amostras oriundas de cadelas.

Tipo Histológico	Nº Amostras	BAX		BCL-x _L	
		Fraco Positivo (%)	Positivo (%)	Fraco Positivo (%)	Positivo (%)
Carcinoma túbulo-papilar	8	37,5	62,5	25	75

Fonte: Autores, 2023.

Figura 1 - Fotomicrografia de carcinoma túbulo-papilar evidenciando a relação percentual de marcação da proteína Bax (A) e Bcl-x_L (B) de forma positiva. IHQ, 20X.



Fonte: Autores, 2023.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

No presente estudo, verificou-se a presença de ambas proteínas expressas de forma predominantemente positiva em carcinoma túbulo-papilar de cadelas (Figura 1). Por possuírem alta expressão da proteína Bcl-x_L assim como uma considerável expressão da proteína Bax, acredita-se que terapias direcionadas para a indução da apoptose possam contribuir com a terapêutica antitumoral nesse tipo histológico maligno de neoplasia mamária.

Ao comparar as porcentagens de marcação de ambas proteínas, pode-se observar ainda, níveis baixos de desregulação nas amostras avaliadas e provindas de carcinoma túbulo-papilar corroborando a ideia de que a desregulação de membros da família BCL-2 contribui com o desenvolvimento tumoral. Yildimirim *et al.* (2014) apresentaram em seus resultados, uma alta presença de Bcl-2 em neoplasias mamárias caninas corroborando a presente pesquisa, onde a marcação da proteína Bcl-x_L comportou-se com expressão categorizada como positiva em sua maioria (Tabela 1).

Por vez, neste mesmo tipo histológico pode-se observar predominância da proteína antiapoptótica Bcl-x_L, outro fator que segundo a literatura, impede a morte de células neoplásicas pela ausência da morte celular programada.

Em um estudo realizado por BAKIREL *et al.* (2016) utilizando uma combinação de deracoxib com doxorubicina pode-se observar aumento no efeito antiproliferativo exercido pela doxorubicina e ainda uma indução da apoptose devido a modulação de bcl-2, proteína que exerce a mesma função que bcl-x_L. Nossos resultados apresentam a presença da proteína Bcl-x_L nos tecidos analisados, com isso, sugere-se a realização de estudos posteriores utilizando os fármacos para modulação da mesma proteína e indução da apoptose em carcinoma túbulo-papilar a fim de proporcionar respostas eficientes em busca de regressões tumorais.

Ainda, Dolka *et al.* (2016) promoveram estudos acerca da expressão de proteínas associadas à apoptose em tumores mamários caninos e observaram alta presença positiva de Bax na maioria dos tipos histológicos estudados. Nosso estudo, apresentou uma expressão da proteína de forma fraco positivo com 37,5% e positivo com 62,5% em carcinoma túbulo-papilar. Dessa forma, nossos achados demonstram alta presença da proteína pró-apoptótica neste tipo histológico e entende-se que devido a sua presença, terapias com indução da apoptose em carcinoma túbulo-papilar responderiam de forma mais eficiente na ativação da apoptose e eliminação de células tumorais.

Conclusão

Com este estudo, conclui-se que houve expressão das proteínas reguladoras da apoptose, Bax e Bcl-x_L em carcinoma túbulo-papilar de forma predominantemente no escore positivo, dessa forma, o tipo histológico em questão pode ser utilizado experimentalmente em terapias direcionadas à apoptose para regressão tumoral.

Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. W.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda., 2019.

BAKIREL, T. *et al.* Synergistic growth inhibitory effect of deracoxib with doxorubicin against a canine mammary tumor cell line, CMT-U27. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 78, n. 4, p. 657–668, 2016.

BURRAI, G. P. *et al.* A Statistical Analysis of Risk Factors and Biological Behavior in Canine Mammary Tumors: A Multicenter Study. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1-12, 2020.

CANADAS-SOUSA, A. *et al.* Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2019.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

DOLKA, I. *et al.* Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. **Research in veterinary science**, v. 105, p. 124-133, 2016.

PAWLAK, A.; HENKLEWSKA, M. The Role of Bcl-xL Protein Research in Veterinary Oncology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2511, 2020.

PETER, B. *et al.* The pan-Bcl-2 blocker obatoclax promotes the expression of Puma, Noxa, and Bim mRNA and induces apoptosis in neoplastic mast cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 1, p. 95–104, 2014.

SCHIFFMAN, J. D; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 370, n. 1673, p. 1-13, 2015.

SHARIFI, S. *et al.* Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. 3, p. 351, 2015.

VILHENA H., *et al.* Canine and feline spontaneous mammary tumours as models of human breast cancer. In: Pastorinho M., editor. **Pets as Sentinels of Human Health in Pets as Sentinels, Forecasters and Promoters of Human Health**. Springer: Cham, Switzerland, p. 137–207, 2019.

YILDIMIRIM, F. *et al.* Evaluation of Bcl-2, Bcl-XL and Bax Expression and Apoptotic Index in Canine Mammary Tumours. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 20, n. 4, p. 513-520, 2014.

ZAMAN, S. *et al.* Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. **Leukemia&lymphoma**, v. 55, n. 9, p. 1980-1992, 2014.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo pelo espaço e materiais cedidos para elaboração da pesquisa apresentada.