

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INVESTIGAÇÃO DO SIGNIFICADO PROGNÓSTICO DA MIMETIZAÇÃO DA
VASCULOGÊNESE E SUA INIBIÇÃO PELO SORAFENIB EM TUMORES
MAMÁRIOS DE CADELAS

MARIA CAROLINA MANGINI PRADO

Botucatu – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INVESTIGAÇÃO DO SIGNIFICADO PROGNÓSTICO DA MIMETIZAÇÃO DA
VASCULOGÊNESE E SUA INIBIÇÃO PELO SORAFENIB EM TUMORES
MAMÁRIOS DE CADELAS

MARIA CAROLINA MANGINI PRADO

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renée Laufer
Amorim

Ficha catalográfica

P896i

Prado, Maria Carolina Mangini

Investigação do significado prognóstico da mimetização da vasculogênese e sua inibição pelo sorafenib em tumores mamários de cadelas / Maria Carolina Mangini Prado. -- Botucatu, 2020
58 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Coorientadora: Renée Laufer Amorim

1. Angiogênese. 2. Cão. 3. Câncer de mama. 4. Ensaio de túbulo. 5.
Drogas antiangiogênicas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia FMVZ - Unesp Botucatu

Prof^a. Dr^a Cristina de O. Massoco Salles Gomes

Membro

Departamento de Patologia, FMVZ- USP.

Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução e Radiologia – Unesp Botucatu.

Dedico esse trabalho à minha mãe (Selma M. Prado), ao meu pai, (Carlos Magalhães Prado - *in memorian*), ao meu marido, (Paulo Henrique G. Oliveira) e à minha filha amada (Marina Prado Oliveira), pelo apoio incondicional em toda minha carreira profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me auxiliaram no desbravamento dessa trajetória desconhecida por mim. Em especial:

À minha mãe, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida pessoal e profissional. Em especial, nesse período final, em que tivemos problemas sérios com a sua saúde, mas Deus permitiu que você permanecesse aqui, comigo, e conseguisse assistir a conclusão dessa, tão importante etapa.

Ao meu marido, Paulo, por compreender, auxiliar e manter a retaguarda enquanto estive ausente elaborando este trabalho. É muito bom saber que você me completa em todos aspectos. Obrigado por ouvir devaneios científicos e opinar no que desconhece, mas se esforça para me ajudar.

À minha querida filha, meu grande amor, que talvez nem saiba, mas certamente foi o divisor de água na minha vida, incentivando-me, diariamente, a ser um ser humano melhor. Agradeço, também, por compreender as minhas ausências, minhas restrições, visando a construção de algo engrandecedor ao nosso futuro.

À minha irmã e grande incentivadora, que nos momentos certos, falou a palavra certa, para que eu me mantivesse firme no caminho.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves, o qual exerce, na plenitude da palavra, o papel de ORIENTAR. É um grande exemplo de como é possível esbanjar conhecimento e sem perder humildade. Muito obrigada, por compreender, quando passei por momentos difíceis, mostrando seu lado mais belo como ser humano. Certamente uma enorme honra tê-lo como orientador profissional e de vida!

À minha co-orientadora Profa. Dra. Renée Amorin Laufer, por auxiliar em momentos difíceis, por me provar que é possível ser mulher, mãe, pesquisadora e líder, sem perder a ternura.

A todos os meus funcionários e colaboradores do Hospital Veterinário, HOSVET Pet, do qual sou proprietária, pois sem vocês cobrindo minha ausência nada seria possível. Vocês são incríveis, são meu motivo de orgulho e inspiração: Lara Guimarães, Joseane de Jesus, Camila Piovezan, João Dálio, Márcia Tineu, Camila Lupércio, Claudenice

Barros, Felipe Jacques, Marina Paiva, Isabel Paiva, Carolina Hagy e Nathália Celeita. Esse trabalho reflete, diretamente, numa melhora profissional a todos nós!

Aos colaboradores eventuais que também me inspiram a evoluir: Émerson, Lucilene, Brayan Lopes, Inajara e Karina Costa.

Aos parceiros de laboratório, com “dias de luta e dias de glória”, mas sempre com palavras de estímulo e auxílio, pessoas com quem pude contar... Vocês foram fundamentais: Priscila Kobayashi, Antônio Leis Filho e Patrícia Lainetti.

A todos meus clientes que entenderam minhas ausências no hospital, mas tenho certeza que ficaram muito bem respaldados pela equipe maravilhosa que temos.

Gratidão enorme a todos...

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	3
CAPÍTULO 1	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 EPIDEMIOLOGIA	6
2.2 ETIOLOGIA	7
2.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E COMPORTAMENTO TUMORAL....	8
2.4 TRATAMENTO.....	12
2.5 CÂNCER DE MAMA CANINO COMO MODELO DE ESTUDO PARA O CÂNCER DE MAMA NAS MULHERES.....	13
2.6 MECANISMOS DE APORTE SANGUÍNEO TUMORAL	14
2.6.1 Vias moleculares de indução de vascularização	15
2.6.2 Alternativas de vascularização tumoral	16
2.7 INIBIDORES DE ANGIOGÊNESE	21
3. REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO	32
ABSTRACT	33
1. INTRODUCTION	34
2. METHODS	35
2.1. STUDY DESIGN	35
2.2. PATIENTS	36
2.3. CD31-PERIODIC ACID SCHIFF (PAS) DOUBLE STAINING FOR VM	37
2.4. VEGF-A AND VEGFR-2 IMMUNOHISTOCHEMISTRY	37
2.5. PRIMARY CELL CULTURE AND ANTI-TUMORAL EFFECT OF SORAFENIB	37
2.6. IN VITRO VM ASSAY AND SORAFENIB ANTITUMOR EFFECT	38
2.7. STATISTICAL ANALYSIS	38

3. RESULTS	38
3.1. CLINICAL INFORMATION	38
3.2. CD31/PAS DOUBLE STAINING	40
3.3. VEGF-A AND VEGFR-2 IMMUNOSTAINING	40
3.4. SORAFENIB IC50 AND VM IN VITRO	40
4. DISCUSSION	44
5. CONCLUSION	45
6. REFERENCES	46

Prado, M. C. M, **Investigação do significado prognóstico da mimetização da vasculogênese e sua inibição pelo sorafenib em tumores mamários de cadelas. Botucatu, 2019.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O carcinoma mamário de cadelas (CMC) é um dos tumores mais importantes em fêmeas caninas não castradas e, devido a semelhança com câncer de mama em mulheres, é considerado um modelo em oncologia comparada. A mimetização de vasculogênese (MV) é um achado histopatológico recorrente em um grupo de CMC que demonstram comportamento agressivo. A MV é um processo que células neoplásicas altamente agressivas formam canais condutores de fluido sem a presença de células endoteliais. Embora a MV tenha sido descrita em carcinomas inflamatórios mamários de cadelas, nenhum estudo prévio investigou o significado prognóstico e preditivo da MV em CMC. Assim, esta pesquisa objetivou investigar o significado prognóstico da MV em casos de CMC, a habilidade das células do CMC em formar túbulos *in vitro* e a capacidade do sorafenib em inibir MV *in vitro*. Esse fármaco foi eleito para estudo, pois em análises prévias, demonstrou atividade significativa contra várias tirosinas quinases receptoras envolvidas na neovascularização e progressão do tumor, incluindo o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR-2). A MV *in situ* foi identificada, inicialmente, pela avaliação morfológica em blocos de parafina e pela dupla marcação de CD31/PAS. Entre todas as amostras de CMC (N=248), a MV foi identificada em 33% das amostras tumorais (82/248). A presença de MV está mais relacionada ao grau do tumor que ao subtipo histológico. Tumores com grau histológico maior (II e III), independente do subtipo histológico, apresentaram estruturas positivas para MV. Além disso, pacientes com MV, tiveram um tempo de sobrevida menor ($p < 0,0001$). Devido à importância da alimentação autócrina de VEGF-A e VEGFR-2 em tumores epiteliais, investigamos a associação de sua imunoexpressão em células tumorais neoplásicas e sua associação com MV. Entre as amostras positivas para MV, todas ($n = 82$) apresentaram escores altos de VEGF-A e VEGFR-2 (3 ou 4), indicando MV como um achado comum na superexpressão tumoral de VEGF-A e VEGFR-2. Assim, foram cultivadas duas linhagens celulares primárias de carcinoma mamário canino (CM9 e CM60), com capacidade de

MV *in vitro* e avaliamos o efeito antitumoral de sorafenib. Para linhagem celular CM9 foi estabelecido IC50 de 2,61 μ M e CM 60 de 1,34 μ M. Foi realizado o ensaio de MV *in vitro* e as células foram tratadas com a dose de IC50 de sorafenib para cada linhagem celular, o qual se mostrou apto a inibir a MV *in vitro*. No geral, nossos resultados indicaram MV como um fator prognóstico para cadelas portadoras de CMC e que o sorafenib tem eficácia *in vitro* de inibir a MV em células cancerígenas de CMC.

Palavras-chave: angiogênese, cão, câncer de mama, ensaio de túbulo, drogas antiangiogênicas.

Prado, M. C. M. **Investigation of prognostic significance of vasculogenic mimicry and its inhibition by sorafenib in canine mammary gland tumors. Botucatu, 2019. Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Canine mammary gland tumor (CMT) is one of the most important tumors in intact female dog and due its similarity to human breast cancer (BC), is considered a model in comparative oncology. A subset of mammary gland tumors can show an aggressive behavior and a recurrent histological finding is the presence of vasculogenic mimicry (VM). VM is a process that highly aggressive cancer cells form, making fluid-conducting channels without endothelial cells. Although VM has been described in canine inflammatory carcinoma, no previous studies have investigated the prognostic and predictive significance of VM in CMT. Thus, this research aimed to investigate the prognostic significance of VM *in vivo* and sorafenib capacity to inhibit VM *in vitro*. VM was identified *in situ*, in formalin fixed paraffin embedded CMT samples (n= 248) using CD31/PAS double staining. VM was identified in 33% of tumors (82/248). The presence of VM was most related to tumor grade than histological subtype. Patients with positive VM experienced a shorter survival time ($P<0.0001$). Due the importance of VEGF-A/VEGFR-2 autocrine feed-forward loop in epithelial tumors, we investigate the association of VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression by neoplastic tumor cells and its association with VM. Among the VM positive samples, all (n=82) showed VEGF-A and VEGFR-2 high scores (3 or 4), indicating VM as a common finding in tumor overexpression VEGF-A and VEGFR-2. Thus, we cultured two CMT primary cell lines (CM9 and CM6), with VM ability *in vitro* and evaluated sorafenib anti-tumoral effect. This drug was elected for study because in previous analyzes it demonstrated significant activity against various receptor tyrosine kinases involved in neovascularization and tumor progression, including vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR-2). CM9 cell line showed an IC_{50} of 2.61 μ M and CM60 of 1.34 μ M. We performed the VM assay *in vitro* and treated the cells with sorafenib in IC_{50} , for each cell line, and it was able to inhibit VM *in vitro*. Overall, our results indicated VM as a prognostic factor for dogs bearing CMT and that sorafenib has an *in vitro* effect inhibiting VM in CMT cancer cells.

Keywords: angiogenesis, dog, breast cancer, tubular assay, antiangiogenic drugs.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Os carcinomas mamários de cadelas (CMC) são as neoplasias mais comuns em cadelas não castradas, sendo um desafio terapêutico frente à alta taxa metastática desses tipos tumorais (GOLDSCHMIDT et al, 2011). Sob a perspectiva de saúde única, CMC são considerados modelos espontâneos para o estudo do câncer de mama em mulheres (DOS ANJOS et al., 2019). Portanto, estudos sobre os CMC podem beneficiar tanto humanos quanto cães. O CMC e o câncer de mama em mulheres compartilham características clínicas, de biologia tumoral, de subtipos histológicos e de locais de desenvolvimento das metástases (DOS ANJOS et al, 2019). Para crescerem e metastatizarem, as células tumorais requerem uma boa suplementação de nutrientes e oxigênio (BARRENO et al., 2019). Para isso, ocorre o processo de neovascularização, a partir da circulação sanguínea existente, que é induzida por hipóxia e pela síntese de fatores pró-angiogênicos (PETROVIC, 2016). Dentre os fatores pró-angiogênicos, a superexpressão do fator de crescimento endotelial – A (VEGF-A) e seu receptor (VEGFR-2) possuem um importante papel na angiogênese tumoral (PETROVIC, 2016; BARRENO *et al*, 2019). A maior expressão em VEGF-A e VEGFR-2 foi previamente demonstrada em carcinomas mamários caninos e humanos (GUO et al, 2010; DOS ANJOS et al, 2019).

Dentre os processos de vascularização tumoral, a mimetização da vasculogênese (MV) é definida como o processo de gerar estruturas similares a vasos sem a presença de células endoteliais, em neoplasias altamente agressivas (GE, LUO, 2018). A MV foi correlacionada com crescimento e metastatização de vários tumores em homens e animais (CLEMENTE et al., 2010; GE, LUO, 2018; SALINAS et al., 2019). A MV é possível pela notável plasticidade de células tumorais agressivas, que induzem a superexpressão de genes associados com fenótipos indiferenciados (QIQI LIU et al., 2016). Muitos mecanismos de sinalização estão envolvidos na formação da MV, mas as moléculas participantes neste processo não são totalmente conhecidas, e estudos atuais vem demonstrando importância de algumas vias (GE, LUO, 2018). Dentre as principais alterações, destacam-se as da via ERK-1/PI3K/MMP-2, e do VEGFR-2. O aumento da expressão de VEGFR-2 pode induzir proliferação celular pela ativação da via quinase regulada por sinal extracelular clássico (ERK), estimulando a modificação das células neoplásicas (LIU et al, 2018). Uma forma de controle da vascularização tumoral é o uso

de fármacos antiangiogênicos, os quais têm como principal objetivo inibir as células endoteliais, através da indução da apoptose dessas células (GE, LUO, 2018). Dentre as terapias antiangiogênicas, o sorafenib é um inibidor de tirosina quinase utilizado no tratamento de neoplasias em humanos (ZHU et al., 2017; KALATHIL et al., 2019; YANG et al., 2019) e de forma mais recente, usado também na medicina veterinária (FOSKETT et al., 2017).

Em humanos, o sorafenib mostrou ter bom efeito antitumoral, por ser efetivo em inibir angiogênese e induzir a apoptose (RAOUL et al., 2017). LEE et al. (2012) usaram sorafenib para inibir o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres e demonstraram indução da apoptose e autofagia, sugerindo que seu uso pode ser indicado no controle da doença tumoral. No entanto, nenhum estudo prévio investigou o efeito antitumoral de sorafenib em CMC.

Por considerarem a MV uma forma de resistência às quimioterapias convencionais, vários pesquisadores tem se empenhado na investigação de modelos para estudar a MV *in vitro* (YAO et al., 2013, BARRENO et al., 2019, SALINAS-VERA et al., 2019) e a formação tubular *in vitro*, com matrigel, tem se mostrado a técnica mais aceitável (SALINAS-VERA et al., 2019).

Devido a importância da MV para o desenvolvimento de metástase, esta pesquisa propôs-se a pesquisar o significado prognóstico da MV em um grande número de carcinomas mamários e sua associação com a expressão de VEGF-A/VEGFR-2. Além disso, foram estabelecidas células de CMC, e foi investigada sua habilidade de formação da MV *in vitro* e a capacidade da inibição de MV do sorafenib *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Assim como nas cadelas, nas mulheres, o câncer de mama é o mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte (GHONCHEH, 2016), portanto, a prevenção do câncer de mama e as inovações terapêuticas têm sido os objetivos principais de muitos pesquisadores. Para isso, se faz necessário um bom entendimento da carcinogênese, do desenvolvimento e da progressão do câncer de mama, o que somente são possíveis através da pesquisa clínica básica (ABDELMEGEED e MOHAMED, 2018).

2.1 EPIDEMIOLOGIA

Os tumores de mama são os mais prevalentes na espécie canina e correspondem a 50 a 70% de todos os tumores (DE NARDI et al, 2016). A incidência de tumor de mama, nas cadelas, depende da origem geográfica, com alta prevalência em países nos quais a castração não é praticada rotineiramente (SORENMO et al, 2013). No Brasil, a taxa de câncer de mama maligno é superior a 70%, sendo 20% a mais do que nos EUA, onde pratica-se a ovário-histerectomia em cadelas pré – púberes (DE NARDI et al, 2016).

A maior incidência de neoplasias mamárias, ocorre em cadelas entre 7 a 12 anos, sendo que as raças de porte maior são acometidas mais cedo que raças pequenas. Já em machos a taxa é menor que 1% (SORENMO et al, 2013).

2.2 ETIOLOGIA

Os tumores de mama têm forte correlação com hormônios sexuais, por isso são mais frequentes em cadelas não castradas (DONNAY, et al, 1995), e aquelas que fazem uso de anticoncepcional recorrente, têm maior predisposição de desenvolverem câncer de mama (RUTTEMAN, et al, 1992).

O estrogênio e a progesterona são necessários ao desenvolvimento da glândula mamária, pois induzem a proliferação do epitélio ductal intralobular, o que resultam no crescimento da glândula mamária, conseqüentemente, influenciam de forma positiva a carcinogênese das neoplasias mamárias (OVERLEY, et al, 2008).

Da mesma forma que os hormônios estimulam a carcinogênese, a ausência dos hormônios, ainda na vida jovem, proporciona proteção às cadelas contra o câncer de mama, portanto, a ovário-histerectomia ou ovariectomia, antes do primeiro cio, proporciona redução no risco de câncer de mama para 0,5%. Já após o primeiro cio, o risco sobe para 8%, e para 26% após o segundo (SONREMO, et al, 2000).

A quantidade de receptores para estrógeno e progesterona na glândula mamária estão inversamente correlacionados com o tamanho tumoral e tipo histopatológico, já que tumores grandes e indiferenciados, como carcinomas anaplásicos, normalmente não expressam esses receptores hormonais, levando a supor que a alta malignidade do tumor faz com que seja independente de hormônios para sua proliferação (DENT, et al 2007).

O hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) estão implicados na carcinogênese tumoral (QUEIROGA, et al, 2010).

Os níveis de prolactina mostram-se aumentados quando dosados no soro sanguíneo de cadelas portadoras de tumores malignos e denotam estar integrados no processo de carcinogênese (QUEIROGA, et al, 2014).

Sobre a etiologia genética, sabe-se que em mulher, a mutação dos genes BRCA 1 e 2, implicam no risco de desenvolvimento de câncer de mama em 85%. Nos cães, apenas a mutação em ambos os genes, pode indicar predisposição (GENTILLE, et al, 2017). No entanto, os estudos ainda são controversos.

2.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E COMPORTAMENTO TUMORAL

Os carcinomas são o tipo histológico mais frequente nas neoplasias mamárias (HELLER, et al, 2005).

O carcinoma inflamatório é um dos subtipos histológicos mais agressivos, e tem sua apresentação clínica peculiar com intensa inflamação da pele, culminando com dor aguda, edema acentuado, eritema, endurecimento e espessamento da região. Essa apresentação clínica é decorrente de êmbolos tumorais presentes nos ductos linfáticos do tecido cutâneo causando estase linfática (CAMACHO, et al, 2014).

CASALI, et al, (2014) apresentaram uma proposta para a classificação histológica a fim de padronizar o diagnóstico, o prognóstico das neoplasias mamárias das cadelas no Brasil (Quadro 1). A graduação histológica dos carcinomas caracteriza-se na avaliação da formação tubular do tumor, no pleomorfismo nuclear e no índice mitótico (GOLDSHMIDT, 2011) (Quadro 2).

Vários aspectos são considerados ao inferir o prognóstico. Um desses aspectos é o tamanho tumoral, haja vista que cães com nódulos menores de 3 cm tem prognóstico significativamente melhores (KARAYANNOPOULOU, et al, 2001). Outro aspecto é a presença de metástase em linfonodos tem impacto negativo na sobrevida (KARAYANNOPOULOU, et al, 2001).

Já que as neoplasias mamárias tem comportamento heterogêneo, para avaliar a extensão da doença, informar o prognóstico e auxiliar nas decisões sobre o tratamento das neoplasias mamárias, foi criado um protocolo de estadiamento da paciente acometida (SORENMO et al, 2019). Informações sobre tamanho tumoral e envolvimento de linfonodos, pontuados no sistema TNM (OWENS, et al, 1980) (Quadro 3), são importantes, no entanto, deve-se considerar outros fatores que podem ser decisivos na escolha de terapias complementares, como: subtipo, grau, invasão vascular, Ki-67

(proliferação celular), presença de receptores hormonais, fator de crescimento epidermal humano (HER-2), moléculas de adesão como E-caderina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e COX-2 (SORENMO, et al, 2019; CASO, et al, 2011;, PEÑA, et al, 2014, CASALI, et al, 2014).

QUADRO 1 – Classificação dos tumores mamários em cadelas

Lesão epitelial não neoplásica	
Hiperplasia epitelial Hiperplasia ductal Hiperplasia lobular Adenose	
Lesões de células colunares	
Alteração de células colunares Hiperplasia de células colunares Lesões atípicas de células colunares Tumores benignos Adenoma Adenoma complexo ou adenomioepitelioma Adenoma basalóide Fibroadenoma Tumor misto benigno Papioma ductal	
Tumores malignos	
Carcinomas	
Carcinoma <i>in situ</i> (ductal e lobular) Carcinoma em tumor misto Carcinoma papilar Carcinoma tubular Carcinoma sólido	
Tipos especiais de carcinomas	
Carcinoma micropapilar Carcinoma lobular invasivo Carcinoma lobular pleomórfico Carcinoma secretório Carcinoma mucinoso Carcinoma rico em lipídeo Carcinoma de células escamosas Carcinoma de células fusiformes Carcinoma anaplásico Neoplasia mamária com diferenciação sebácea	
Neoplasias mioepiteliais	
Adenomioepitelioma maligno	
Sarcomas	Outros sarcomas
Fibrossarcoma Osteossarcoma Carcinossarcoma Sarcoma em tumor misto	Condrossarcoma Lipossarcoma Hemangiossarcoma

Fonte: Cassali, et al, 2014.

QUADRO 2 - Critérios de graus de malignidade para tumores mamário caninos.

A. Formação tubular	Pontos	
	1	Formação de túbulos maior que 75%
	2	Formação de túbulos entre 10 e 75% (moderada formação de arranjos tubulares misturadas em áreas de crescimento sólido)
	3	Formação de túbulos menor que 10% (mínima ou nenhuma formação de túbulos)
B. Pleomorfismo Nuclear		
	1	Uniforme ou núcleos pequenos e regulares e nucléolo ocasional
	2	Moderado grau de variação de tamanho e forma nuclear, núcleo hipercromático e presença de nucléolo (alguns dos quais podem ser proeminentes)
	3	Variação marcada em tamanho nuclear, núcleo hipercromático, com pelo menos 1 nucléolo evidente ou mais.
C. Mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA)		
	1	0 a 9 mitoses / 10 CGA
	2	10 a 19 mitoses/ 10 CGA
	3	≥ 20 mitoses / 10 CGA
Graduação de Malignidade Histológica		
Total do escore (A + B + C)	Pontos	Grau de Malignidade
	3 a 5	I (baixo, bem diferenciado)
	6 a 7	II (intermediário, moderadamente diferenciado)
	8 a 9	III (alto, fracamente diferenciado)

Fonte: adaptado de Goldschmidt, et al, 2011.

A presença de MV, está associada a um prognóstico ruim, pois está ligada ao comportamento tumoral agressivo por proporcionar e facilitar metástases para sítios distantes (GE, LUO, 2018).

QUADRO 3 – Estadiamento das neoplasias mamárias em cadelas.

Estadio	Tamanho Tumoral	Estatus Nodal (comprometimento de linfonodo)	Metástase a Distância
1	<3cm (T1)	N0	M0
2	3 a 5 cm (T2)	N0	M0
3	>5 cm (T3)	N0	M0
4	Qualquer T	N1 (positivo)	M0
5	Qualquer T	Qualquer N	M1 (presença de metástase)

Fonte: Adaptada de RUTTEMAN et al, 2011.

M = Metástase; N = Linfonodo; T = Tamanho de tumor

Níveis altos de VEGF-A e VEGFR-2 estão associados ao pior resultado em pacientes com câncer de mama humano, assim, a via de sinalização VEGF-A / VEGFR-2 exibe valor prognóstico e preditivo (GHOSH, et al, 2008).

A alta taxa de mortalidade no câncer de mama deve-se principalmente a doenças metastáticas (MARCONATO, et al, 2009). Os mecanismos para a ocorrência de metástases são variáveis e requerem várias fases, começando com a perda de contato entre as células vizinhas, a penetração nas paredes dos vasos, adesão na nova localização e angiogênese (SIMONETTI, et al, 2012). Uma das principais características dos tumores de mama são sua alta capacidade de angiogênese e invasão em vasos linfáticos e sanguíneos (CLEMENTE et al, 2010), sendo os principais órgãos afetados: linfonodos, pulmão, fígado, baço pele, encéfalo, ossos e rins, os sítios mais comumente afetados (DE NARDI, et al, 2016).

Em humanos, as interações entre células cancerígenas e estroma são críticas para o crescimento e invasão do tumor (EGEBLAD et al, 2010). Existem evidências de que células cancerígenas e estromais interagem de maneira coordenada para facilitar a proliferação, invasão e angiogênese, remodelando o microambiente tumoral via proteases, associadas com a matriz, que decompõem a membrana basal e as proteínas da matriz extracelular (BROOKS, et al, 2010).

Durante o desenvolvimento embrionário, as células epiteliais perdem sua polaridade e são convertidas em um fenótipo mesenquimal. Esse processo é denominado transição epitelial-mesenquimal (NIETO, et al, 2016). Durante a progressão do câncer, ocorre a ativação da transição epitelial-mesenquimal, a qual permite que as células cancerígenas adquiram propriedades migratórias, invasivas e de célula tronco (NIETO et al, 2016).

2.4 TRATAMENTO

Atualmente, não existe uma terapia padrão-ouro para o câncer de mama das cadelas devido à natureza heterogênea da doença (HULLIN, et al, 2017). A escolha da terapia depende do estadiamento tumoral e do estado geral da paciente. Neoplasias com alto grau de malignidade e com grande chance de metástases, tem indicação de se fazer uso de quimioterapia adjuvante (DE NARDI, et al, 2016).

No caso de neoplasias primárias não metastáticas, a exérese cirúrgica da cadeia mamária é o procedimento que confere melhor controle da doença, não indicada apenas para o carcinoma inflamatório (SORENMO, et al, 2003). Para esse tipo tumoral a cirurgia está contraindicada pela extensão da lesão microscópica, profunda e difusa, pelo alto risco de metástases e pelo risco de coagulopatia (MARCONATO, et al, 2009) portanto, deve-se fazer uso de fármacos potentes de controle de dor, associados à quimioterapia e / ou inibidores de COX-2 (CAMACHO, et al, 2014).

Para a realização da exérese cirúrgica da cadeia mamária, é necessário o conhecimento da drenagem linfática da glândula mamária acometida, o que pode ser um fator anatômico variável de paciente para paciente (PEREIRA, et al, 2008). Nesse contexto, o uso de marcação do linfonodo sentinela com azul patente é um aliado importante, pois torna visível o fluxo de linfa até a marcação do linfonodo responsável pela drenagem da mama acometida (TSOPELAS, et al, 2002).

A ovário – histerectomia, pode ser efetuada no mesmo tempo cirúrgico, desde que seja manipulada a neoplasia após a síntese da parede abdominal, evitando que células tumorais semeiem a cavidade abdominal (CASSALI, et al, 2014).

A quimioterapia adjuvante é recomendada para tumores malignos de alto risco, no entanto, sua real eficiência é desconhecida (SORENMO, et al, 2003). Carcinoma sólido, carcinoma micropapilar, carcinoma anaplásico, carcinossarcomas e linfonodos

comprometidos tem indicação de uso de quimioterapia antineoplásica (CASSALI, et al, 2014).

Dentre os protocolos quimioterápicos propostos, os que associam doxorrubicina à ciclofosfamida, ou carboplatina como agente único, têm demonstrado melhores resultados (SORENMO, et al, 2003). Ao final do tratamento quimioterápico, os pacientes devem ser monitorados a cada 3 meses no primeiro ano, a cada 6 meses no segundo ano e depois anualmente (GOLDSCHMIDT, et al, 2011).

O uso de inibidores de COX-2 parecem ser boa opção como agentes únicos ou associados a quimioterápicos no controle da doença, já que tumores mamários de pior prognóstico apresentam alta expressão de COX-2 (DE NARDI, et al, 2016).

Quimioterapia metronômica, consiste da administração diária ou em dias alternados de baixas doses de quimioterápicos, o que confere baixa toxicidade à paciente e, estudos pré-clínicos sugerem que o principal alvo dessa modalidade de terapia, são as células endoteliais tumorais (FOX, et al, 2007). A quimioterapia em baixa dose afeta diretamente os capilares tumorais (parada do crescimento e apoptose de células endoteliais ativadas), mas também induz a produção de um inibidor da angiogênese, trombospondina-1 e suprime a mobilização de precursores de células endoteliais (KERBEL, et al, 2004).

2.5 CÂNCER DE MAMA CANINO COMO MODELO DE ESTUDO PARA O CÂNCER DE MAMA NAS MULHERES

Nas mulheres, o câncer de mama também é o tumor mais comum, estimando-se 1 milhão de novos casos ao ano e, devido ao seu alto poder metastático, está associado à alta mortalidade (DE NARDI, et al, 2002). As semelhanças clínicas entre cadelas e mulheres incluem a incidência espontânea de tumores, a idade de início, a etiologia hormonal e o curso idêntico da doença. O tipo histológico, carcinoma, é o mais frequente em ambas espécies (QUEIROGA, et al, 2011). Além disso, os fatores que afetam o resultado clínico, incluindo o tamanho do tumor, estadió clínico e invasão de linfonodos, são equivalentes (QUEIROGA, et al, 2011).

Em humanos, quase todos os fatores de carcinogênese são semelhantes aos da cadela, no entanto, fatores de dieta e obesidade são melhor esclarecidos nas mulheres, como fatores predisponentes para o desenvolvimento de neoplasias (PICON-RUIZ, *et al*, 2017). A obesidade diminui a concentração sérica de globulina ligada a hormônio,

aumentando estrógeno livre. Além disso o tecido adiposo pode ser uma fonte de aumento na produção de estrógeno (CARLSON, et al, 2019).

Devido à escassez de amostras de tecido humano e às questões éticas relacionadas com a realização de pesquisas em seres humanos, os pesquisadores requerem modelos *in vivo* e *in vitro* de câncer de mama de mulheres (GHONCHEH, et al , 2016). Os modelos *in vitro* mais utilizados são as culturas celulares (GAZDAR et al, 1998). Os modelos *in vivo* incluem xenotransplantes e animais com forma espontânea de desenvolvimento de câncer em mama, como cadelas e gatas (HOLEN, et al, 2017).

ABDELMEGEED e MOHAMED (2018), fizeram um amplo estudo comparando, de forma molecular e genética as células de câncer de mama canino e humano, e comprovaram as semelhanças celulares das 2 espécies. Do ponto de vista *in vitro*, já foi validado que células de carcinoma mamário de cadelas compartilhavam características ultra - estruturais semelhantes ao carcinoma mamário de mulheres, sendo um bom modelo de estudo para essa doença (BARRENO, et al, 2019).

Carcinoma mamário inflamatório canino e humano são considerados os tipos histológicos mais agressivos de câncer de mama, demonstrando os piores prognósticos tanto a humanos quanto para cães (CAMACHO, et al, 2014).

No câncer de mama humano, marcadores moleculares (receptores de estrogênio e progesterona e HER-2) são rotineiramente usados para fins prognósticos e preditivos (WALKER, et al, 2008). Na medicina veterinária, embora alguns potenciais marcadores prognósticos tenham sido investigados em tumores mamários caninos, como marcadores de proliferação (SARLI, et al, 2002), receptores hormonais (DE LAS MULAS, et al, 2005) e oncogenes (FERREIRA, et al, 2009) nenhum foi adotado no processamento histopatológico de rotina. Isso se deve, em parte, ao pequeno número de estudos prospectivos de sobrevivência multivariáveis que demonstraram seu valor prognóstico (SANTOS et al, 2013). Portanto, a investigação de marcadores com valor prognóstico e preditivo ainda é necessária para reconhecer os pacientes que têm indicação de receber terapias adjuvantes, bem como para identificar novos alvos terapêuticos (SANTOS, et al, 2013).

2.6 MECANISMOS DE APORTE SANGUÍNEO TUMORAL

É consenso de que tumores requerem um bom aporte sanguíneo para crescerem e disseminarem, e muita atenção tem sido focada no papel da angiogênese - o recrutamento de novos vasos em um tumor a partir de vasos pré-existentes (FOX, et al, 2007). No entanto, a angiogênese pode não ser o único mecanismo pelo qual os tumores adquirem uma microcirculação (FOLBERG, et al, 2000).

A vasculatura do tumor não é necessariamente derivada do surgimento de células endoteliais; ao invés disso, o tecido cancerígeno pode adquirir sua vasculatura por cooptação de vasos pré-existentes, crescimento microvascular intussusceptivo, vasculogênese pós-natal, angiogênese glomerulóide ou mimetização vasculogênica (DOME, et al, 2007)

2.6.1 Vias moleculares de indução de vascularização

Quando os tumores atingem um tamanho de cerca de 0,2 a 2,0 mm de diâmetro, tornam-se hipóxicos e de tamanho limitado na ausência de angiogênese (FOX, et al, 2007). A hipóxia é a consequência fisiológica de uma microcirculação estrutural e funcionalmente alterada (HARRIS, 2002). Um amplo e diversificado espectro de alterações genéticas está associado ao desenvolvimento do "fenótipo angiogênico" (DOME, et al, 2007).

Há cerca de 30 fatores pró-angiogênicos endógenos e cerca de 30 anti-angiogênicos endógenos. Para aumentar de tamanho, os tumores sofrem uma troca angiogênica, onde predomina a ação de fatores pró-angiogênicos, resultando em angiogênese e progressão tumoral (ROSKOSKI, 2007)

Os tumores que sofrem com a baixa oxigenação, aumentam a resposta ao fator induzível por hipóxia (HIF) (MAXWELL, 2005), então co-ativadores e polimerases são recrutados e ocorre ativação transcricional de várias vias gênicas envolvidas na angiogênese, assim, é provável que a resposta ao estresse hipóxico através do HIF seja um mecanismo pelo qual ocorra a remodelação contínua dos vasos (FOX, et al, 2007).

O óxido nítrico é derivado do endotélio e promove a angiogênese por inibição da apoptose, aumento da proliferação e migração das células endoteliais (COOKE, 2003). O aumento na expressão de óxido nítrico é mediado pela enzima dimetilarginina dimetilamio-hidrolase (DDAH), portanto, sugere-se que esta enzima seja importante na modulação da angiogênese (HULLIN, et al, 2017).

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs de 22 nucleotídeos, aproximadamente, e tem sido descritos como principais reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, inibindo a tradução de RNAs mensageiros (RICARTE FILHO, KIMURA, 2006). Já foi descrita a importância do miR-193 no câncer como supressor em vários tipos de câncer de linhagens celulares de câncer de pâncreas (JIN, et al, 2015), cérebro (ZHONG, et al, 2014), próstata (RAUHALA, et al, 2010), pele (CHEN, et al, 2010) e mama (YANG, et al, 2014). No entanto, apenas alguns alvos do miR-193 foram identificados e HULLIN (2017) sugere que a expressão de miR-193 regula a atividade de DDAH-1 na mimetização da vasculogênese.

Outro mecanismo para conduzir a angiogênese é o aumento da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), após a regulação de HIF. A família VEGF humana consiste em VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (FOX, et al, 2007). Devido à importância da angiogênese na progressão tumoral, a inibição da sinalização de VEGF representa um tratamento promissor para o câncer (ROSKOSKI, 2007).

Conforme descrito, VEGF e seu receptor (VEGFR) são importantes no favorecimento do aporte sanguíneo e ou linfático para o tumor (KUREBAYASHI, et al, 1999). Em humanos, a expressão do fator A de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) aumenta com base no grau do tumor, portanto, um tumor com maior grau histológico apresenta níveis mais altos de VEGF-A, conferindo pior prognóstico (KOUTRAS, et al, 2005).

O receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2) é um dos principais mediadores da atividade do VEGF-A (GHOSH, et al, 2008). A expressão de VEGF foi previamente investigada em tumores de mama caninos e constatada a forte correlação entre a expressão do VEGF e a angiogênese tumoral (QUEIROGA, et al, 2011), e com a metástase em linfonodos (QUIO, 2008).

2.6.2 Alternativas de vascularização tumoral

Durante o desenvolvimento tumoral várias alternativas de vascularização podem ser recrutadas, uma delas é o processo denominado como brotamento, no qual, os vasos inicialmente dilatam e se tornam porosos em resposta ao fator de permeabilidade vascular / fator de crescimento endotelial vascular (VPF / VEGF) (DVORAK, et al, 1995) (figura 1).

A neovascularização por brotamento é regulada por fatores inibidores e pro-angiogênicos: Citocinas angiogênicas promovem a proliferação, a migração e a formação de lúmen de células endoteliais, enquanto inibidores interferem nestas etapas e modulam a atividade endotelial (CARMELIET, 2005).

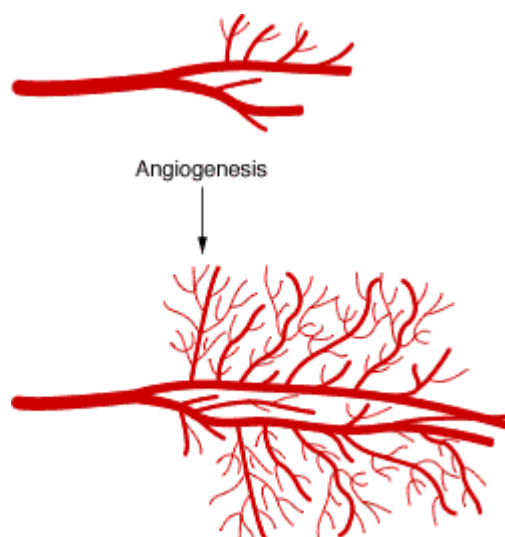


FIGURA 1. Ilustração da angiogênese por brotamento a partir de vasos pré-existentes.
 Fonte: https://project.inria.fr/mastic/files/2019/07/CafeIn_Habbal_2019_support.pdf

A cooptação de vasos (figura 2) é descrita como o processo em que os tumores sequestram a vasculatura existente, portanto, englobando-a e retirando-a do estroma normal para satisfazer suas necessidades metabólicas (FOX, et al, 2007; HOLASH, et al, 1999).

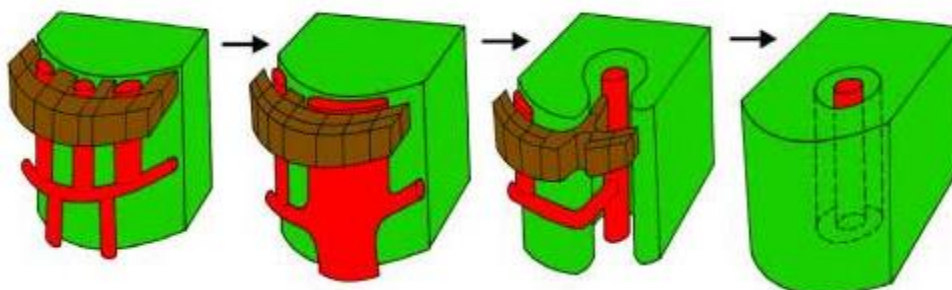


FIGURA 2. Ilustração esquemática do processo de cooptação vascular. Observa-se em verde a representação da massa tumoral, englobando os vasos sanguíneos existentes,

representados em vermelho e, em marrom, o estroma normal sendo destruído. Fonte: DÖME, et al, 2007.

O crescimento microvascular intussusceptivo (figura 3) refere-se à formação da rede de vasos pela inserção de colunas de tecido conjuntivo, denominadas pilares de tecido, no lúmen do vaso e ao crescimento subsequente desses pilares, resultando na divisão do lúmen do vaso (PANTAN, 2000). Esse tipo de angiogênese, observado em uma ampla variedade de tecidos normais e malignos, é rápida e demanda menos energia do que o surgimento de novos vasos, ocorre em horas ou até minutos e não depende primariamente da proliferação das células endoteliais, degradação da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo (KURZ, et al, 2003).

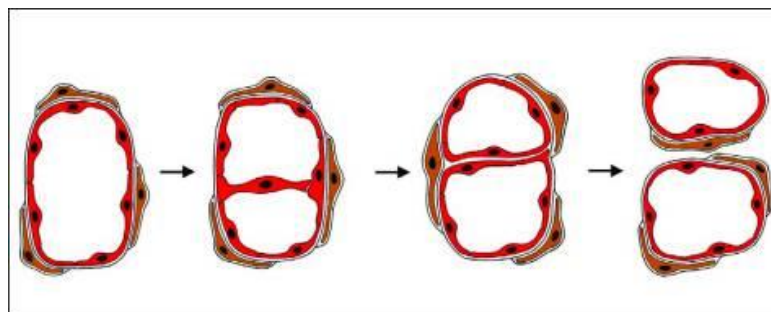


FIGURA 3. Ilustração esquemática do processo de intussuscepção vascular, na qual formam-se pilares luminiais levando a bipartição. Fonte: DÖME et al., 2007.

A angiogênese glomerulóide (figura 4) característica de glioblastomas também é observado em câncer de mama invasivo (BRAT, VAN MEIR, 2001). Estes são agregados vasculares, altamente complexos, que se assemelham aos glomérulos do rim, compostos por uma rede de capilares que são revestidos de forma variável pela membrana basal e pericitos (FOX, et al, 2007). Sua presença está associada a uma sobrevida significativamente menor no câncer de mama (STRAUME, et al, 2002). Esse processo é mediado, principalmente por VEGF e leva ao aparecimento de estruturas vasculares espiraladas simples, que mais tarde se desenvolvem em angiogênese glomerulóide com vários capilares aferentes e eferentes estreitados (FOX, et al, 2007).

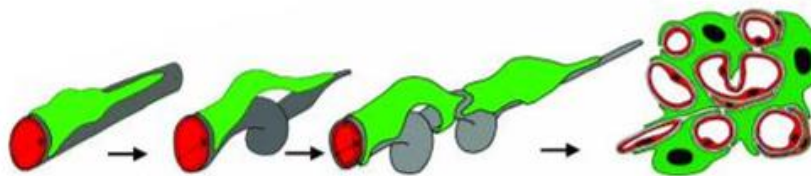


Figura 4. Ilustração esquemática do processo de angiogênese glomerulóide, na qual há o rearranjo vascular em alusão ao glomérulo renal. Fonte: DÖME, et al., 2007

A vasculogênese pós-natal consiste da formação de novos vasos a partir de células progenitoras endoteliais (CPEs), derivadas da medula óssea que se diferenciam em células endoteliais, por mediação de citocinas tumorais (ASAHARA, KAWAMOTO, 2004). O aumento de VEGF circulante foi correlacionado com o número de CEPs na circulação na progressão tumoral (DÖME, et al, 2007).

A mimetização da vasculogênese (MV) consiste na capacidade de algumas células cancerígenas agressivas de expressarem fenótipo de células endoteliais e formar redes de túbulos semelhantes a vasos, sem a participação de células endoteliais (MANIOTIS, et al, 1999). Essas descobertas apoiam a premissa de que células agressivas adquirem um fenótipo de plasticidade multipotente, confirmando que células tumorais podem mascarar-se como outros tipos celulares, com propriedades semelhantes a células-tronco embrionárias (DÖME, et al, 2007).

As evidências de MV foram descritas pela observação direta e exames histopatológicos, inclusive em tumores de mama caninos e humanos, e está ligada a agressividade da doença (CLEMENTE, et al, 2010).

A MV foi confirmada em carcinomas de mama, próstata, ovário e pulmão; sarcoma sinovial, rabdomiossarcoma e feocromocitoma (HENDRIX, et al, 2003). As células tumorais não apenas assumem a morfologia das células endoteliais, mas também adquirem características fenotípicas do endotélio, expressando vários marcadores vasculares (FOX, et al, 2007).

As células da MV submetidas a estudos de imuno-histoquímica foram positivas a CK e CK14 (confirmando serem de origem epitelial e neoplásica), uma alta taxa de células de mimetismo também co-expressam vimentina e citoqueratina (demonstrando a indiferenciação) (CLEMENTE, et al, 2010).

Em relação à marcação endotelial com CD31, há controvérsias entre os autores, sendo que alguns demonstram sua marcação e outros negam (CAI, et al, 2004, GE, LUO, 2018; CLEMENTE, et al, 2010).

Embora o mecanismo da MV ainda não esteja claro, estudos descobriram que a cascata de sinalização ERK-1 (regulador de mobilidade celular) / PI3K (ativa a cascata) / MMP-2 (degrada a matriz extracelular) pode ser crítica para a formação de MV (Liu, 2018). Além disso, VEGFR-2, como a maioria dos receptores de tirosina quinase (RTKs), induziu a proliferação pela ativação da via clássica quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), portanto, o VEGFR-2 na superfície das células tumorais pode estar associado à formação de MV (LIU, et al, 2018)

Uma metanálise de CAO, et al, (2013), compreendendo 15 tipos de tumores malignos humanos, revelou que pacientes com câncer positivo para MV apresentaram uma sobrevida global menor em cinco anos, em relação a pacientes com câncer negativo para MV. Dessa forma, a presença de redes MV é prognóstica de baixa sobrevida, pois confere aumento do potencial metastático através da entrada de células tumorais na vasculatura (WAGENBLAST, et al, 2015).

Os miRNAs desempenham um papel importante na modulação da migração, invasão e angiogênese de células cancerígenas (GE, LUO, 2018). Diversos trabalhos demonstraram a eficiência no uso de miRNA na inibição da MV (LIU, et al, 2017; WAN, et al, 2014; SONG, et al, 2013), porém espectro completo de mecanismos de miRNAs para inibição da MV do tumor ainda precisa ser elucidado (GE, LUO, 2018).

Até o momento, as terapias antiangiogênicas atuam principalmente nos vasos sanguíneos dos tumores formados por células endoteliais, portanto, GE, LUO (2018) afirmam que a formação de MV é uma das razões da limitação efeitos terapêuticos desses medicamentos.

Embora enormes esforços tenham sido feitos na tentativa de eliminar a formação de MV e alguns medicamentos demonstrem um resultado promissor, ainda estão em andamento pesquisas sobre estratégias de tratamento para combater a MV (GE, LUO, 2018). É importante reconhecer esse tipo de neovascularização, principalmente, se for o principal mecanismo de aporte sanguíneo pois pode restringir a eficácia terapêuticas dos agentes antiangiogênicos convencionais (FOX, et al., 2007).

As estratégias atuais de tratamento, como a quimioterapia, são ineficientes no câncer agressivo. Assim, a VM é um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias anticâncer, e muitos medicamentos foram investigados (GE, LUO, 2018).

Vários pesquisadores tem se empenhado na investigação de modelos para estudar MV *in vitro* (YAO, et al., 2013, BARRENO, et al., 2019, SALINAS-VERA, et al, 2019) e a formação tubular em matrigel tem se mostrado a técnica mais aceitável (SALINAS-VERA et al., 2019).

2.7 INIBIDORES DE ANGIOGÊNESE

Baseado no fato de que o acesso ao suprimento sanguíneo tem papel principal no crescimento do tumor e na metastização (HULLIN, et al, 2017) através de redes vasculares intra-tumorais formadas pela angiogênese ou remodelamento vascular, surgiram os tratamentos baseados em terapias antiangiogênicas que são bastante promissoras teoricamente, porém os benefícios obtidos são modestos e não mostraram aumentar a sobrevida a longo prazo (NISHIDA, et al, 2006).

Como a família de citocinas reguladoras-chave dos vasos tumorais é o sistema VEGF / VEGFR, sua modulação pode ajudar no remodelamento da vasculatura do tumor e na melhoria da liberação de agentes quimioterápicos (JAIN, et al, 2006).

DÖME, et al, (2007) supõe que a terapia angiossupressora só possa ser aplicada quando a vascularização do câncer envolver brotação das células endoteliais e / ou vasculogênese pós-natal, pois acredita que o alvo das terapias seria a inibição da proliferação de células endoteliais.

A inibição da MV é relatada para anular o desenvolvimento do tumor, mas atualmente, ainda não se conhece bem os mecanismos moleculares que regulam a MV, e nem se eles se sobrepõem à angiogênese clássica, mas, tem sido sugerido, que uma regulação positiva de genes relacionados à angiogênese possa estar envolvida (SHIRAKAWA, et al, 2001).

Fármacos antiangiogênicos comuns têm como principal alvo a formação de células endoteliais por induzir apoptose das mesmas e reduzir a proliferação de tumores agressivos (GE, LUO, 2018).

Dentre as terapias antiangiogênicas, sorafenib é um inibidor de tirosina quinase utilizado em medicina humana (ZHU et al., 2017; KALATHIL et al., 2019; YANG et al.,

2019) e de forma mais recente, usado também na medicina veterinária (FOSKETT et al., 2017). Esse fármaco demonstrou atividade significativa contra várias tirosinas quinases receptoras envolvidas na neovascularização e progressão do tumor, incluindo o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) -2, VEGFR-3, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas β , Flt-3, e c-KIT (SCOTT, et al, 2004). As análises da densidade de microvasos nas mesmas seções de tumor usando anticorpos CD31 demonstraram inibição significativa da neovascularização em todos os três modelos de xenoenxerto estudados (SCOTT, et al, 2004).

Em humanos, sorafenib mostrou-se efetivo em inibir angiogênese por induzir apoptose e ter bom efeito antitumoral (RAOUL et al., 2017). LEE et al. (2012) usaram sorafenib para inibir o desenvolvimento de câncer de mama de mulheres e demonstraram sucesso na indução da apoptose e autofagia, sugerindo que seu uso pode ser indicado no controle da doença tumoral.

ESCUДИER, et al (2007) realizaram um estudo clínico com 903 pessoas portadoras de carcinoma renal, e concluíram que os pacientes que receberam sorafenib apresentaram o dobro do tempo de sobrevida que àqueles que receberam placebo. LLOVET, et al (2008), também tiveram resultado semelhante, quando trataram pacientes com carcinoma hepático irresssecável.

3. REFERÊNCIAS:

ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human diseases. **Oncology Letters**, West Lafayette, v. 15, n. 6, p. 8195-8205, jun. 2008. DOI 10.3892 /ol.2018.8411PMCID:PMC6004712

ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, Chuo-ku, v. 287, 3, p. C572-579, set. 2004.

BARRENO, L. *et al.* Vasculogenic mimicry-associated ultrastructural findings in human and canine inflammatory breast cancer cell lines. **BMC Cancer**, Madri, v. 19, n. 750, jul. 2019. DOI 10.1186/s12885-019-5955-z.

BRAT, D. J e VAN MEIR, E. G. Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. **American Journal of Pathology**, Atlanta v. 158, n. 3, p. 789-796, mar. 2001. DOI 10.1016/S0002-9440(10)64025-4.

BROOKS, S. A. *et al.* Molecular interactions in cancer cell metastasis. **Acta Histochemica**, Winnipeg, v.112, n. 1, p. 3–25, jan. 2010. DOI 10.1016/j.acthis.2008.11.022.

CAI, X. S. *et al.* Tumor blood vessel formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. **Chinese Medical Journal**, Shanghai, v. 117, n.1, p. 94-98, jan. 2004.

CAO, Z. *et al.* Tumour vasculogenic mimicry is associated with poor prognosis of human cancer patients: a systemic review and meta-analysis. **European Journal of Cancer**, Jiangsu, v. 49, n. 18, p. 3914–3923, 2013.

CARLSON, L. *et al.* Early breast development in overweight girls: does estrogen made by adipose tissue play a role? **International Journal of Obesity**, Durham, v. 43, p. 1978-1987, ago. 2019, DOI 10.1038/s41366-019-0446-5.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, Leuven , v. 438, p. 932–936, dez. 2005.

CASO, A. *et al.* Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **Plos One**, Philadelphia v. 12, n. 7, jun.2017, DOI 10.1371/journal.pone.0180448.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumor – 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Patology**, Belo Horizonte, v. 7, p. 38-69, 2014.

CHEN J. *et al.* MicroRNA-193b suppresses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. **The American Journal of Pathology**, Ontario v. 176, n. 5, p. 2520-2529, mai. 2010, DOI 10.2353 / ajpath.2010.091061.

CLEMENTE, M. *et al.* Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. **Veterinary Pathology**, Madrid, v. 47, n. 2, p. 265-274, 2010, DOI 10.1177/0300985809353167.

COOKE, J. P. NO and angiogenesis. **Atherosclerosis Supplements** – Elsevier, Houston, v. 4 n. 4, p. 53–60, dez. 2003, DOI 10.1016 / S1567-5688 (03) 00034-5.

COSTA, C. D. *et al.* Characterization of OCT3/4, Nestin, NANOG, CD44 and CD24 as stem cell markers in canine prostate cancer. **The International journal of Biochemistry and Cell Biology**, Botucatu, v. 108, p. 21-28, mar. 2019, DOI 10.1016/j.biocel.2019.01.002.

DE LAS MULAS, J.; MILLÁN, Y.; DIOS, R. A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in dog mammary tumors. **Veterinary Pathology**, Córdoba, v. 42, n. 2, p. 200-212, 2005, DOI 10.1354 / vp.42-2-200.

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**, Belo Horizonte, v.7, p15-26, 2002, DOI 10.5380 / avs.v7i2.3977

DENT, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research**, Singapore, v. 13, p. 4429–4434, 2007, DOI 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.

DIESSLER, M. E. *et al.* Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. **Veterinary and Comparative Oncology**, La Plata v. 15, n. 2, p. 450-461, 2017, DOI 10.1111/vco.12189.

DÖME, B. *et al.* Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. **The American Journal of Pathology**, Budapest, v. 170, p.1–15, 2007.

DÖME, B. *et al.* Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. **The Journal of Pathology** Budapest, v. 197, n. 3, p. 355-362, jul. 2002.

DONNAY, I. *et al.* Comparison of estrogen and progesterone receptor expression. in dog normal and tumoral tissues. **American Journal of Veterinary Research**, Louvain-la-Neuve, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.

DOS ANJOS, D. S. *et al.* Deregulation of vegfr-2 and pdgfr expression and microvascular density in a triple-negative model of canine malignant mammary tumors with lymph node or lung metastasis. **Veterinary Sciences**, Franca, v. 6, n. 1, Jan. 2009, DOI 10.3390/vetsci6010003.

DVORAK, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, Boston, v. 146, n. 5, p. 1029-1039, mai. 1995.

ESCUDIER, B. *et al.* Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, Villejuif, v. 356, n. 2, p. 125-134. 2007.

FARANDA, T. *et al.* Differential expression profiling of long non-coding RNA GAS5 and miR-126-3p in human cancer cells in response to sorafenib. **Scientific Reports**, Brescia, v. 9, n. 1, p. 9118, jun. 2019, DOI 10.1038/s41598-019-45604-2.

FERREIRA, E. *et al.* The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, Belo Horizonte, v. 7, p. 230–235, 2009, DOI 10.1111/j.1476-5829.2009.00193.x.

FOLBERG, R.; HENDRIX, M. J.; MANIOTIS, A. J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, Illinois, v. 156, p. 361–381, 2000.

FOSKETT, A. *et al.* Tolerability of oral sorafenib in pet dogs with a diagnosis of cancer. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, Leesburg, v. 8, n. 8, p. 97-102, 2017, DOI 10.2147/VMRR.S149678.

FOX, S. B.; GENERSLI, D. G.; HARRIS, A. L., Breast tumour angiogenesis. **Breast Cancer Research**, Melbourne, v. 9, n. 6, p. 216, 2007, DOI: 10.1186/bcr1796.

GAZDAR, A. F. *et al.* Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. **International Journal of Cancer**, Dallas, v. 78, p. 766-774, dez. 1998, DOI 10.1002/(SICI)1097-0215(19981209)78:6.

GE, H.; LUO, H. Overview of advances in vasculogenic mimicry – a potential target for tumor therapy. **Cancer Management and Research**, Zhengzhou, v. 2, n. 10, p. 2429-2437, 2018, DOI 10.2147/CMAR.S164675.

GENTILE, L. B. *et al.* Establishment of mixed primary cell cultures from spontaneous dog mammary tumors: Characterization of classic and new cancer-associated molecules. **Plos One**, São Paulo, v. 12, n. 9, e. 0184228, set. 2017, DOI 10.1371/journal.pone.0184228.

GHONCHEH, M.; POURNAMDAR, Z.; SALEHINIYA, H. Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer worldwide. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Iran, v. 17, p. 43-46, 2016, DOI 10.7314/APJCP.2016.17.S3.43.

GHOSH, S. *et al.* High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer. **Human Pathology**, New Haven, v. 39, p. 1835–1843, 2008, DOI 10.1016/j.humpath.2008.06.004

GOLDSCHIMIDT, M. *et al.* Classification and grading of canine mammary tumors, **Veterinary Pathology**, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 117-131, 2011, DOI 10.1177/0300985810393258.

GUO, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, Atlânta, v. 1806, n. 1, p. 108-121, 2010, doi:10.1016/j.bbcan.2010.04.004.

HARRIS, A. L. Hypoxia: A key regulatory factor in tumor growth. **Nature Reviews - Cancer**, Oxford, v. 2, p. 38-47, 2002, DOI 101038/nrc704.

HELLER, D. A. *et al.* Cyclooxygenase -2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, Philadelphia, v. 46, p. 776-780, 2005.

HENDRIX, M. J. *et al.* Vasculogenesis mimicry and tumor cell plasticity: lessons from melanoma. **Nature Reviews – Cancer**, Iowa, v. 3, n. 6, p. 411-421, 2003.

HOLASH, J. *et al.* Cooption, regression and vessel growth in angiopoietin and VEGF mediated tumors. **Science**, New York, v. 199, n. 284, p. 1994-1998, 1994, DOI 101126/science.284.5422.

HOLEN, I. *et al.* In vivo models in breast cancer research: Progress, challenges and future directions. **Disease Models and Mechanisms**, Sheffield v. 10, p.359–371, 2017, DOI 10.1242/dmm.028274.

HORI, A. *et al.* Vasculogenic mimicry is associated with trastuzumab resistance of HER2-positive breast cancer. **Breast Cancer Research**, Osaka, v.21, n. 1, p. 88, 2019, DOI 10.1186/s13058-019-1167-3.

HULLIN, J. A. *et al.* MiR-193b regulates breast cancer cell migration and vasculogenic mimicry by targeting dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1. **Scientific Reports**, South Australia, v. 7, 2017, DOI 10.1038/s41598-017-14454-1.

JAIN, R. K. *et al.* Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, Massachusetts, v. 3, n.1, p. 42-40, jan. 2006.

JIN, X. *et al.* MiR-193 – KRAS axis dysregulation contributes to impaired cell growth in pancreatic cancer. **Plos One**, Beijing, v. 10, e. 0125515, 2015, doi: 10.1371 / journal.pone.0125515.

KALATHIL, S. G. *et al.* Augmentation of IFN- γ + CD8+ T cell responses correlates with survival of HCC patients on sorafenib therapy. **JCI Insight**, New York, v. 4, n. 15, pii. 130116, ago. 2019, DOI 10.1172/jci.insight.130116.

KAPLAN, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, Washington, v.438, p. 820–827, 2005.

KARAYANNOPOULOU, M. *et al.* Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**, Thessaloniki, v. 133, n.4, p. 246-252, 2005.

KERBEL, R. S. e KAMEN, B. A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. **Nature**, Toronto, v. 6, n.4, 423- 436, jun. 2004.

KIM, L. H. *et al.* Sorafenib potentiates ABT-737-induced apoptosis in human oral cancer cells. **Archives of Oral Biology**, Jeonju, v. 73, p. 1-6, 2017, DOI 10.1016/j.archoralbio.2016.08.034.

KOUTRAS, A.; KOTOULA, V.; FOUNTZILAS, G. Prognostic and predictive role of vascular endothelial growth factor polymorphisms in breast cancer. **Pharmacogenomics**. Patras, v. 16, n. 1, p. 79-94, 2015, DOI 10.2217/pgs.14.148.

KUREBAYASHI, J. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. **Japanese Journal of Cancer Research**, Okayama, v.90, p. 977-981, 1999.

KURZ, H.; BURRI, P. H.; DJONOV, V. G. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. **News in Physiological Sciences**, Freiburg, v. 18, p.65-70, abr. 2003.

LAINETI, P. F. *et al.* Establishment and Characterization of canine mammary gland carcinoma cell lines with vasculogenic mimicry ability *in vitro*. **Veterinary Quarterly**, Botucatu, 2019.

LEE, Y. Y. *et al.* Abstract 4651: Sorafenib and its derivatives induce apoptosis and autophagy in canine mammary tumor cells, 2012, DOI 10.1158/1538-7445.AM2012-4651.

LI, S. *et al.* Inhibitory effects of compound DMBT on hypoxia-induced vasculogenic mimicry in human breast cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Shandong, v.96, p. 982-992, 2017, DOI 10.1016/j.biopha.2017.11.137.

LIU, W. *et al.* Micro RNA-27b functions as a new inhibitor of ovarian cancer-mediated vasculogenic initiation by suppressing LV-cadherin expression. **RNA**, Jiangsu, v. 23, n. 7, p. 1019-1027, 2017.

LIU, Z. J. L. *et al.* *In vitro* and *in vivo* apatinib inhibits vasculogenic mimicry in melanoma MUM-2B cells, **Plos One**, Sichuan, v. 13, n. 7, e. 0200845, jul. 2018, DOI

LLOVET, J. M. *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, **The New England Journal of Medicine**, New York, v. 359, n.4, p. 378-390, 2008, DOI 10.1056/NEJMoa0708857.

MANIOTIS, A. J. *et al.* Vascular canal formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic imitation. **American Journal of Pathology**, Iowa, v. 155, p. 739-752, 1999.

MAXWELL, P. H. The HIF pathway in cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v. 16, p. 523-530, 2005, DOI 10.1016 / j.semcdb.2005.03.001.

NIETO, M. A.; *et al.* EMT: 2016. **Cell**, San Juan de Alicante, v.166, n.1, p. 21–45, jun. 2016, DOI 10.1016/j.cell.2016.06.028.

NISHIDA, N. *et al.* Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, Fukuoka, v. 2, n.3, p. 2013-219, jan. 2006, DOI 10.2147/vhrm.2006.2.3.213.

OVERLEY, B. *et al.* Association between Ovariectomy and Feline Mammary Carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v.19, n.4, p. 560-563, DOI 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02727.x.

OWENS, L. *et al.* Classification of Tumors in Domestic Animals. 1st ed., Geneva: **World Health Organization**, 1980.

PEÑA, L. *et al.* Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and immunohistochemical evaluation of hormone receptors. **Veterinary Pathology**, Madrid, v. 51, n. 1, p. 127-145, jan. 2014, DOI: 10.1177 / 0300985813509388.

PEREIRA, C. T. *et al.* 99mTc-labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, São Paulo, v. 49, n. 5, p. 487-491, 2008.

PETROVIC N. Targeting angiogenesis in cancer treatments: Where do we stand? **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, South Australia, v. 19, n. 2 p. 226-238, 2016, DOI 10.18433/jpps.v19i2.27608.

PICON-RUIZ, M. *et al.* Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. **A Cancer Journal for Clinicians**, Miami, v. 67, n. 5, p. 378-397, 2017, DOI 10.3322/caac.21405.

QIQI, L. *et al.* The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Shandong, v. 20, n. 9, p. 1761–1769, 2016, DOI: 10.1111/jcmm.12851PMCID: PMC4988285.

QUIO, C. W. *et al.* Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. **Veterinary Research**, Beijing, v. 32, p. 463-472, 2008, DOI 10.1007/s11259-008-9049-7.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Serum and intratumoral GH and IGF-I concentrations: prognostic factors in canine breast cancer outcome. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 396-403, 2010, Vila Real, DOI 10.1016 / j.rvsc.2010.03.016.

QUEIROGA, F. L. *et al.* COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **Veterinary Journal**, Vila Real, v. 189, n. 1, p. 77-82, 2011.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: Most recent findings. **In vivo**, Vila Real, v. 25, p. 455-465, 2011.

QUEIROGA, F. L. *et al.* Clinical and prognostic implications of serum and tissue prolactin levels in canine mammary tumours. **Veterinary Research**, Vila Real, v. 175, n. 16, p. 403, 2014, DOI 10.1136/vr.102263.

RAOUL, J. L. *et al.* An in-depth review of chemical angiogenesis inhibitors for treating hepatocellular carcinoma. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, Marseille, v. 18, n. 14, p. 1467-1476, 2017, DOI 10.1080/14656566.2017.1378346.

RAUHALA, H. E. *et al.* MiR – 193b is a putative epigenetically regulated tumor suppressor in prostate cancer. **International Journal of Cancer**, Tampere, v.127, p. 1363-1372, 2010, DOI 10.1002 / ijc.25162.

RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. Micro RNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 50, n. 6, 2006.

ROSKOSKI JR., R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Horse Shoe, v. 62, n. 3, p. 179-213 jun. 2007.

RUTTEMAN, G. R. **Contraceptive steroids and the mammary gland: is there a hazard? - Insights from animal studies.** Breast Cancer Research Treatment, v. 23, n. 1-2, p. 29-4, 1992.

SALINAS-VERA, Y. M. *et al.* Hypoxamirs profiling identify mir-745 as a regulator of the early stages of vasculogenic Mimicry in SKOV3 ovarian cancer cells. **Frontiers of Oncology**, Cidade do México, v.9, p. 381, DOI 10.3389/fonc.2019.00381.

SANTOS, A. A. *et al.* Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study, **BMC Veterinary Research**, Porto, v. 9, n. 1, 2013, DOI 10.1186/1746-6148-9-1.

SANTOS, A. *et al.* VEGFR-2 expression in malignant tumours of the canine mammary gland: a prospective survival study. **Veterinary and Comparative Oncology**, Lisboa, v. 14, n. 3, p. 83-92, 2016, DOI 10.1111/vco.12107.

SARLI, G. *et al.* Prognostic value of histological stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Bolonha, v. 14, p. 25–34, 2002, DOI 10.1177 / 104063870201400106.

SCOTT, M. W. *et al.* BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis, **Cancer Research**, Richmond, v. 64, n. 19, 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-0401443.

SHIRAKAWA, K. *et al.* Absence of endothelial cells, central necrosis and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. **Cancer Research**, Tokyo, v. 61, p. 445-451, 2001.

SIMONETTI, S. *et al.* Immunophenotyping analysis in invasive micropapillary carcinoma of the breast: role of CD24 and CD44 isoforms expression. **Breast**, Naples, v. 21, p. 165–170, 2012.

SONG Y. *et al.* MicroRNA-9 inhibits vasculogenic mimicry of glioma cell lines by suppressing Stathmin expression. **Journal of Neuro-oncology**, Harbin, v. 115, n. 3, p. 381–390, 2013. DOI 10.1007/s11060-013-1245-9.

SORENMO, K. U. *et al.* Development and testing of prognostic biological scoring for canine mammary gland carcinomas. **Veterinary and Comparative Oncology**, Philadelphia, mai. 2019, DOI 10.1111 / vco.12509.

SORENMO, K. U. Canine Mammary Gland Tumor. **Veterinary Clinics of north America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, p. 573–596, 2003.

SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M.H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. (ed.). **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5th ed. St Louis: Elsevier: 2013. p. 538–556.

SORENMO, K. U.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. ; Effect of castration and castration time on the survival of dogs with breast carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 266–270, 2000.

STRAUME, O. *et al.* Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. **Cancer Research**, Geneva, v. 62, p. 6808–6811, 2002.

SUN, B. *et al.* Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports**, Tianjin, v. 16, n. 4, p. 693–698, 2006.

TSOPELAS, C. e SUTTON, R. Why certain dyes are useful for localizing the sentinel lymph node. **Journal of Nuclear Medicine**, Adelaide, v. 43, n. 10, p. 1377–82, 2002.

WAGENBLAST, E. *et al.* A model of breast cancer heterogeneity reveals vascular mimicry as a driver of metastasis. **Nature**, New York, v. 520, p. 358–362, 2015, DOI 10.1038/nature14403.

WALKER, R. A. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, Leicester, v. 61, p. 689–696, 2008.

WAN, H. Y. *et al.* MiR – 124 suppresses vasculogenic mimicry and cellular motility by targeting amotL1 in cervical cancer cells. **Cancer Letters**, Tianjin, v. 355, n. 1, p. 148–158, 2014.

WANG, Y. *et al.* TP53 INP1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via the ROS/snail signalling axis in breast cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Tianjin, v. 22, n. 7, p. 3475–3488, 2018, DOI 10.1111/jcmm.13625.

WU, H. B. *et al.* Autophagy-induced KDR/VEGFR-2 activation promotes the formation of vasculogenic mimicry by glioma stem cells. **Autophagy**, Chongqing, v. 13, n. 9, p. 1528-1542, 2017, DOI 10.1080/15548627.2017.1336277.

YANG, Z. *et al.* Tumor supressor microRNA-193b promotes breast câncer progression by targeting DNAJC13 and RAB22A. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, Jilin, v. 7, p. 7563-7570, 2014.

YANG, T. *et al.* Ultrasound-triggered nanodroplets for targeted co-delivery of sorafenib/doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy, **Journal of Biomedical Nanotechnology**; Jilin, v. 15, n. 9, p. 1881-1896, 2019, DOI 10.1166/jbn.2019.2823.

YAO, X. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by Glioma stem-like cells. **Plos One**, Mariland, v. 8, n. 3, e. 57188, 2013, DOI 10.1371 / journal.pone.0057188.

ZANOTTO-FILHO, A. *et al.* Sorafenib improves alkylating therapy by blocking induced inflammation, invasion and angiogenesis in breast cancer cells. **Cancer Letters**, Florinópolis, v. 425, p. 101-115, 2018, DOI 10.1016/j.canlet.2018.03.037.

ZHONG, Q. *et al.* MiR- 193b promotes cell proliferation targeting Smad 3 in human glioma. **Journal of Neuroscience Research**, Shandong, v. 92, p. 619-626, 2014, DOI 10.1002 / jnr.23339.

ZHU, Y. J. *et al.* New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 38, n. 5, p.614-622, 2017, DOI 10.1038/aps.2017.5.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO SUBMETIDO À REVISTA**“FRONTIERS IN ONCOLOGY”**

Para o Special Issue: “Neovascularization, Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Cancer”

Fator de Impacto: 4.137

Normas disponíveis em: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology#author-guidelines>

As figuras foram inseridas no texto para facilitar a visualização da banca avaliadora.

Investigation of prognostic significance of vasculogenic mimicry and its inhibition by sorafenib in canine mammary gland tumors

Maria Carolina Mangini Prado¹, Sofia de Almeida Losant Macedo¹, Giulia Gumiero Guiraldelli², Patricia de Faria Lainetti¹, Antonio Fernando Leis-Filho¹, Priscila Emiko Kobayashi², Renee Laufer-Amorim², Carlos Eduardo Fonseca-Alves^{1,3*}

¹Department of Veterinary Surgery and Anesthesiology, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

²Department of Veterinary Clinic, Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil

³Institute of Health Sciences, Universidade Paulista – UNIP, Bauru, Brazil.

*** Correspondence:**

Carlos E. Fonseca-Alves
carlos.e.alves@unesp.br

Keywords: angiogenesis, dog, breast cancer, tubular assay, antiangiogenic drugs.

Abstract

Canine mammary gland tumor (CMT) is one of the most important tumors in intact female dog and due its similarity to human breast cancer (BC), is considered a model in comparative oncology. A subset of mammary gland tumors can show an aggressive behavior and a recurrent histological finding is the presence of vasculogenic mimicry (VM). VM is a process that highly aggressive cancer cells form, making fluid-conducting channels without endothelial cells. Although VM has been described in canine inflammatory carcinoma, no previous studies have investigated the prognostic and predictive significance of VM in CMT. Thus, this research aimed to investigate the

prognostic significance of VM *in vivo* and sorafenib capacity to inhibit VM *in vitro*. VM was identified *in situ*, in formalin fixed paraffin embedded CMT samples (n= 248) using CD31/PAS double staining. VM was identified in 33% of tumors (82/248). The presence of VM was most related to tumor grade than histological subtype. Patients with positive VM experienced a shorter survival time ($P<0.0001$). Due the importance of VEGF-A/VEGFR-2 autocrine feed-forward loop in epithelial tumors, we investigate the association of VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression by neoplastic tumor cells and its association with VM. Among the VM positive samples, all (n=82) showed VEGF-A and VEGFR-2 high scores (3 or 4), indicating VM as a common finding in tumor overexpression VEGF-A and VEGFR-2. Thus, we cultured two CMT primary cell lines (CM9 and CM6), with VM ability *in vitro* and evaluated sorafenib anti-tumoral effect. CM9 cell line showed an IC_{50} of 2.61 μ M and CM60 of 1.34 μ M. We performed the VM assay *in vitro* and treated the cells with sorafenib in IC_{50} , for each cell line, and it was able to inhibit VM *in vitro*. Overall, our results indicated VM as a prognostic factor for dogs bearing CMT and that sorafenib has an *in vitro* effect inhibiting VM in CMT cancer cells.

1 Introduction

Canine mammary gland tumor (CMT) is one of the most common tumors in intact female dogs, being a therapeutic challenging due its metastatic rate (Goldschmidt et al., 2011). In a One Health perspective, CMT can be considered a spontaneous model for studying human Breast Cancer (BC) (Dos Anjos et al., 2019). Thus, studies done in CMT can benefit both humans and dogs. CMT and human BC shares many clinical and pathological similarities, including the hormonal regulation (Dos Anjos et al., 2019). To grow and metastasize, tumor cells require enough supply of nutrients and oxygen (Barreno et al., 2019). The process of formation of new vessels from existing ones, known as neoangiogenesis, is induced by hypoxia and production of proangiogenic factors (Petrovic, 2016). Among the angiogenic factors, vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) overexpression and its receptor (VEGFR-2) play a key role (Petrovic, 2016; Barreno et al., 2019). The VEGF-A/VEGFR-2 deregulation was previously demonstrated in canine CMT (Dos Anjos et al., 2019) and human BC (Guo et al., 2010).

Vasculogenic mimicry (VM) is defined as the process used by highly aggressive neoplastic cells that generate vascular-like structures, without the presence of endothelial cells (Ge and Luo, 2018). VM has been extensively described in various tumors and participates in tumor spread and metastasis (Clemente et al., 2010; Qiqi Liu et al., 2016; Ge and Luo, 2018; Salinas et al., 2019). Many signaling mechanisms are involved in the formation of VM. Molecules that are involved in this process are being investigated, aiming to develop new strategies for therapeutic targets against cancer (Ge and Luo, 2018). Although the mechanism of VM is not yet clear, studies have found that the ERK-1/PI3K/MMP-2 signaling pathway may be critical for it. In addition, VEGFR-2 can induce proliferation through activation of the classical extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. Therefore, VEGFR-2 expression by tumor cells may be associated with VM formation (Liu et al., 2018). Common anti-angiogenic drugs primarily target endothelial cells by inducing apoptosis of these cells and reducing proliferation of aggressive tumors (Ge and Luo, 2018). Among the antiangiogenic

therapies, sorafenib is a tyrosine kinase inhibitor widely used in human medicine (Zhu et al., 2017; Kalathil et al., 2019; Yang et al., 2019) and recently used in veterinary medicine (Foskett et al., 2017).

In humans with liver cancer, sorafenib has been shown to be effective in inhibiting angiogenesis and inducing apoptosis, with good antitumor effect (Raoul et al., 2017). Lee et al. (2012) used sorafenib to inhibit the development of human BC cell lines and showed an effective induction of apoptosis and autophagy, indicating its use in human patients with BC. However, to our knowledge, there are no previous studies investigating sorafenib antitumor effect in canine mammary cancer cell lines. Several researchers have been investigating models to study MV *in vitro* (Yao et al., 2013, Barreno et al., 2019, Salinas-Vera et al., 2019). Due the importance of VM for the development of cancer metastasis and its relation with patients prognosis, this research aimed to verify the role of VM in canine mammary tumor *in vitro* and *in vivo* and evaluate the association of VEGF-A/VEGFR-2 expression in canine mammary carcinoma tumor samples. Besides that, we evaluated the sorafenib effect on inhibition of VM in canine mammary gland tumor cells *in vitro*.

2 Methods

2.1 Study design

This study was performed in accordance with the national and international guidelines for use of animals in research. All procedures were approved by the institutional Ethics Committee for the Use of Animals (protocol number: CEUA 0091/2018). The experiment was design in two steps. The first one, we selected cases of canine mammary gland tumor from the archives of Veterinary Teaching Hospital of São Paulo State University (UNESP), between 2008 until June 2019. These cases were used to evaluate the association of vasculogenic mimicry with clinical pathological information. In the second step, we performed a transcriptome analysis from two CMT cell lines (Costa et al., 2019) and we identified several differentially expressed genes and ontology process, including *VEGF* deregulation. Among the biological process, we found several pathways related to tyrosine kinase inhibitors. Due this result, we investigate the association of VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression. The study design is detailed in Figure 1.

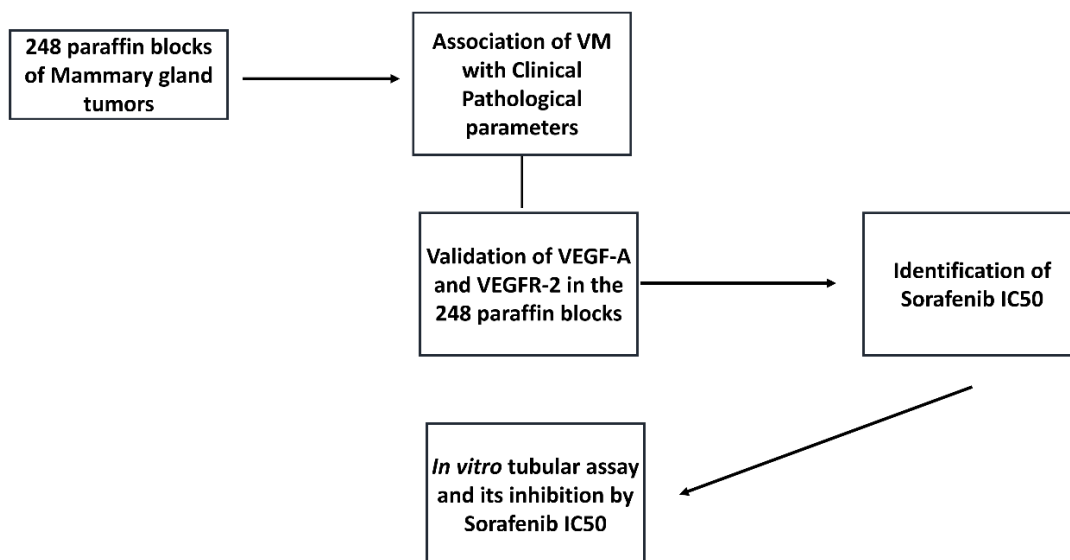


Figure 1. Graphic representation of the study design. It was selected 248 mammary gland tumors from the veterinary pathology service and samples were evaluated for the presence of vasculogenic mimicry (VM). Then, we performed CD31/PAS double staining for identifying VM structures, confirming samples positive for VM. Two canine mammary gland tumor cells were selected and in vitro tubular assay as performed to identifying cellular VM ability and the transcriptome was performed to selected drug target. Based on our transcriptome analysis, we selected VEGF-A/VEGFR-2 and validate its expression in our tumor group. Confirming the association of VEGF-A/VEGFR-2 expression with VM, we did in vitro assays to evaluate sorafenib (VEGFR-2 inhibitor) ability to inhibits VM in vitro.

2.2 Patients

We retrospectively included 248 canine mammary gland tumor-bearing dogs treated with surgery, associated or not with chemotherapy. Our inclusion criteria were patients treated with surgery associated or not with chemotherapy, clinical information available in the records, presence of the paraffin block in the veterinary archive for immunohistochemistry evaluation and patients that did not received chemotherapy prior surgery. The histological classification was performed according to Goldschmidt et al. (2011), and tumor histological grade according to Karayannopoulou et al. (2005). For the clinical evaluation, the patients underwent complete blood count, abdominal ultrasound and three-view thoracic radiographic examination. The clinical stage was established according to the World Health Organization classification for CMT (stages I-IV), modified by Sorenmo et al. (2013). Patients with at least stage III disease and at least tumor histological grade II received adjuvant or patients with metastatic at the diagnosis were indicated to be treated with chemotherapy. Clinical follow-up was according to Dos Anjos et al (2019).

2.3 CD31-periodic acid Schiff (PAS) double staining for VM

All procedures for the CD31/PAS double staining were performed according to Kim et al. (2019). Briefly, tissue sections (N=248) were stained using rabbit polyclonal anti-CD31 primary antibody (PECAM-1, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) for blood endothelial cells identification using a polymer system conjugated with peroxidase as first staining. Then, sections were contra stained with 0.5% PAS and Schiff. The criteria for considering CD31 and/or PAS positive VM and procedures for positive/negative control were according to Kim et al. (2019). VM was characterized by tubular formation or fracture-like structure by tumor cells containing red blood cells with CD31 and/or PAS positive expression (Kim et al. 2019).

2.4 VEGF-A and VEGFR-2 Immunohistochemistry

Because we found *VEGF* deregulation in transcriptome analysis, we performed VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression in the 248 tumor samples used to evaluate VM formation and prognosis. The procedure for VEGFR-2 immunohistochemical detection, evaluation and controls were previously described by our research group (Dos Anjos et al., 2019). The VEGF-A immunostaining was performed using a mouse monoclonal antibody (clone VG1, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA). The antigen retrieval was achieved by citrate buffer pH 6.0 in a pressure cooker (Pascal, Dako, Carpinteria, CA, USA) and endogenous peroxidase was blocked with 8% hydrogen peroxide diluted in methanol for 10 min. Then, samples were incubated with the primary antibody overnight and after, with a polymer system (Envision, Dako, Carpinteria, CA, USA) for 1 hour. The samples were incubated with 3,30-diaminobenzidine (DAB, Dako, Carpinteria, CA, USA) for 5 min and counterstaining with Harris hematoxylin for 1 min. The blood vessels in the tumor samples were used as an intern positive control. For negative control, mouse (Negative Control Mouse, Dako, Carpinteria, CA, USA) immunoglobulin was used in a new CMT section. All antibodies have cross-reaction with canine tissue provided by manufacturer. For the immunohistochemical analysis, the evaluators (MCMP and CEFA) were blinded from the patient's clinical data, histological type and grade.

2.5 Primary cell culture and anti-tumoral effect of sorafenib

The establishment of canine mammary cell cultures followed a previous description of our research group (Costa et al. 2019) and all procedures for establishment, characterization and culture of the CM9 and CM60 mammary primary cells were described previously (Lainetti et al., 2019). Sorafenib anti tumoral effect was determined by the assay based on the cleavage of MTT salt into purple crystals by metabolically active cells. For this experiment, each cell line was seeded in a 96-well plate specific for cell culture, containing DMEM F12 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% of FBS (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% of penicillin and streptomycin. The cells were maintained for 24 hours at 37 °C. After this initial period, the cells were cultured and incubated in medium without serum and sorafenib was added to the media at 2 µM, 4 µM, 6 µM, 8 µM, 10 µM, 12 µM, 14 µM and 16 µM for 24 hours. For MTT

control, we used not treated cells (basal control) and cells treated with the highest DMSO concentration (control of DMSO toxicity). In the same plate, each dosage was tested in triplicate and each replicate in triplicate (3x3). After 24 h incubation, 10 μ L of MTT labeling reagent was added to each well and the plate was incubated at 37°C for 4h. After, the cultures were solubilized, and the spectrophotometric absorbance of the samples was detected using a microtiter plate reader at 570nm.

2.6 In vitro VM assay and sorafenib antitumor effect

This experiment was based on two steps. First, we evaluated the moment in cell culture, of the highest VM formation in the two CMT cell lines (CM9 and CM60). After knowing this information, we treated the cells with sorafenib (2.61 μ M for CM9 and of 1.34 μ M for CM60). All experiments were done in triplicate with negative controls (cells treated with the DMSO).

All experiments were performed with 80% confluent cell cultures. Three-dimensional (3D) cell cultures were prepared in a 24-well plate, adding 200 μ L of Matrigel (Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free, Corning, New York, NY, USA) in each well and air-dried for 30 min, at room temperature. Then, cell cultures were trypsinized and 50,000 cells were suspended in 500 μ L of DMEN medium without fetal bovine serum and seeded on each well. The cells were incubated in a humid atmosphere with 5% of CO₂ at 37°C. The cells were evaluated for VM in an inverted microscope at 1, 2 3, 4, 5, 6 and 7 hours.

The cells showed the best tubular lane at 4 hours. Thus, we performed the 3D experiments in triplicate as described above. However, we seeded cells in a 24-well plate adding the sorafenib, according to the IC₅₀ for each cell line. After 4 hours, we evaluated VM formation in an inverted microscope in treated cells compared to control. The control was performed in triplicate adding the DMSO concentration of IC₅₀ for each cell.

2.7 Statistical Analysis

The clinicopathological data was evaluated in a descriptive way, with the data presented as percentage. We evaluated patient's survival with clinical pathological data, including the presence VM and VEGF-A and VEGFR-2 expression. The survival curves were generated using Kaplan-Meier analysis. The Chi-square or Fisher exact tests was used to evaluate the correlation of VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression with clinicopathological parameters. Samples with score 1 and 2 were considered VEGF-A or VEGFR-2 low expression and samples with score 3 and 4 were considered high expression. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v.8.1.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3 Results

3.1 Clinical information

Two hundred twenty-three patients (223/248) had malignant mammary gland tumors and the remaining 25, benign (25/248). Regarding the malignant tumors, carcinoma in mixed tumor was the most common histological subtype (77/223), followed by complex carcinoma (49/223), tubulopapillary carcinoma (24/223), tubular carcinomas (21/223),

solid carcinoma (16/223), comedocarcinoma (10/223), inflammatory carcinoma (9/223), malignant myoepithelioma (5/223), micropapillary invasive carcinoma (4/223), carcinosarcoma (3/223), adenosquamous carcinoma (2/223), anaplastic carcinoma (2/223) and mucinous carcinoma (1/223). Regarding the benign tumor, benign mixed tumor was the most common tumor subtype (14/25), followed by simple adenoma (6/25) and complex adenoma (5/25). Patients with inflammatory carcinomas and carcinosarcomas experiences the shorter survival time ($P < 0.0001$). The complete clinical information can be found in Table 1.

Table 1. Clinical parameters of the 248 dogs used in this study.

Variables	Benign Tumors	Malignant Tumors	P value
Number of cases	25 (10%)	223 (90%)	
Age	9.2 $\pm$ 1.99	10.1 $\pm$ 2.01	$P > 0.05$
Breed			
Pure	15 (60%)	152 (61.3%)	$P > 0.05$
Mixed	10 (40%)	71 (38.7%)	$P > 0.05$
Ovariohysterectomy			
Yes	0 (0%)	49 (19.7%)	$P > 0.05$
No	25 (100%)	199 (80.2%)	$P > 0.05$
Ulceration			
Absent	25 (100%)	196 (79.1%)	$P > 0.05$
Present	0 (0%)	52 (20.9%)	$P < 0.05$
Histological grade*			
I	-	105 (50.9%)	-
II	-	60 (29.1%)	-
III	-	41 (20%)	-

* For histological grade, it was used 206 dogs.

Forty-two out of 248 canine mammary samples were not histological graded, since they were for being benign tumors (25) or special tumor subtypes (17). Regarding the 206 graded tumors, grade I tumors were the most frequent (105/206), followed by grade II (60/206) and grade III (41/206). Not surprisingly, patients with grade III tumors experienced the shorter survival time ($P < 0.001$), followed by patients with grade II and patients with grade I. Regarding the lymph node status, in 14 out of 248 cases, lymph node histopathology was not performed. Thirty-two patients had lymph node metastasis at the diagnosis. Patients showing lymph node metastasis at the diagnosis experienced the shorter survival time ($P < 0.0001$).

3.2 CD31/PAS double staining

Among all CMT samples (N=248), VM was identified in 33% of tumor samples (82/248). The presence of VM had a higher relation with tumor grade than histological subtype (Figure 2). Thus, only tumors with higher grade (II or III), independent of tumor subtype, presented VM-positive structures. Besides that, patients with positive VM structures experienced a shorter survival time ($P<0.0001$) (Figure 2).

3.3 VEGF-A and VEGFR-2 Immunostaining

Due the evidence of several pathways involving tyrosine kinase binding, including *VEGF* gene, we evaluated the VEGF-A and VEGFR-2 expression in a large number of CMT. VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression was identified in endothelial and neoplastic tumor cells. Among all tumor samples, 178 (74%) out of 248 were positive for VEGF-A. Sixty-five samples had score 1 (73/178), forty-three score 2 (52/178), forty-one score 3 (25/178) and thirty-four score 4 (28/178). Interestingly, patients with higher VEGF-A scores experience lower survival time ($P<0.0001$). VEGF-A score showed a positive correlation with VM. Regarding VEGFR-2 expression, 65 (26%) out of 248 CMT were negative. Among the positive VEGFR-2 samples (N=183), 65 out of 183 had score 1, 43 score 2, 41 score 3 and 34 score 4. Patients with VEGFR-2 score 4 experienced the lowest survival time ($P<0.0001$) (Figure 2). Besides that, samples with VEGFR-2 score 3 and 4 were also positive for VM. The VEGF-A and VEGFR-2 immunoexpression are shown in Figure 3.

3.4 Sorafenib IC_{50} and VM in vitro

Since we identified *VEGF-A* and *VEGFR-2* downregulation in CMT tumor samples, we investigated sorafenib antitumor effect in our CMT cells. Sorafenib has been shown to affect viability in primary cells cultures with CM9 cell line, showing an IC_{50} of 2.61 μ M and for CM60 of 1.34 μ M. Both cell lines also showed VM ability in vitro after four hours (Figure 4). Sorafenib IC_{50} , for each cell line, was able to inhibit in vitro VM and CM9 and CM60 cell lines lack ability to form vascular-like structures in vitro (Figure 4).

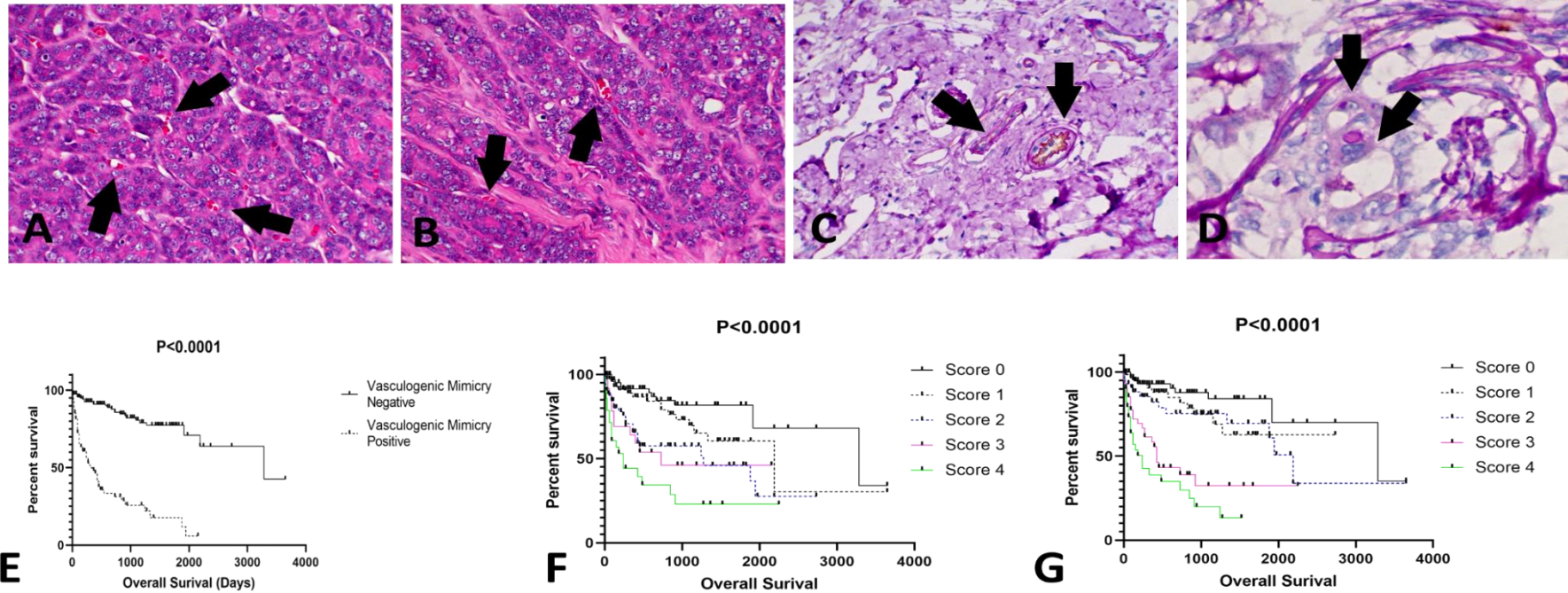


Figure 2. Evaluation of vasculogenic mimicry (VM) in canine mammary gland tumors. A and B: Histological appearance of tubular like-formation by neoplastic cells with red cells in the lumen (arrows), 200x. C: positive internal control of CD31/PAS double staining. Note the double positivity for both CD31 (brown staining) and PAS (pink staining) (arrows), 200x. D: tubular-like structure (arrows) formed by neoplastic epithelial cells, positive for PAS, 400x. E: Overall survival of patients with tumor positive or negative for VM structures. Patients with tumor presenting VM experienced a shorter survival time ($P < 0.0001$). Besides that, we identified an association of VEGF-A and VEGFR-2 expression with survival time. Patients with higher scores (3 or 4) VEGF-A (F) or VEGFR-2 (G) experienced a shorter survival time.

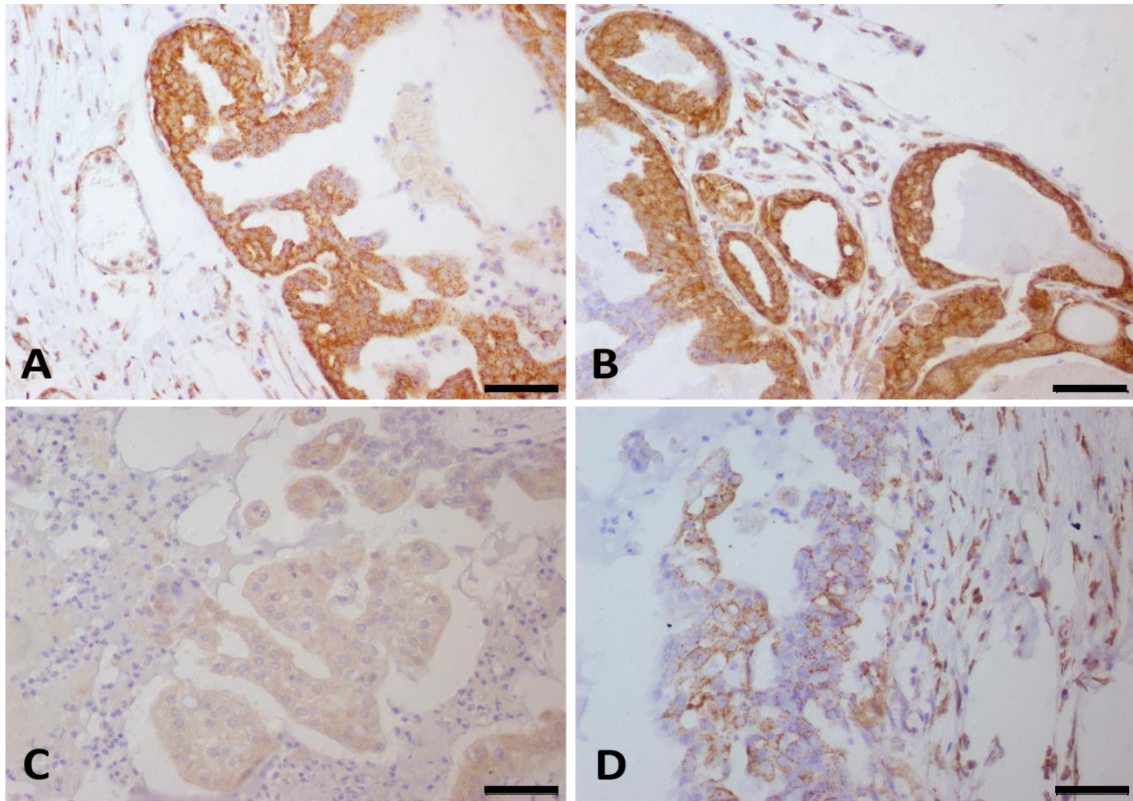


Figure 3. VEGF-A and VEGFR-2 expression in canine mammary gland tumor samples. It is observed a strong (score 4) VEGF-A (A) and VEGFR-2 (B) expression in the same tumor samples. C: canine mammary gland tumor showing a score 2 of VEGF-A expression. D: canine mammary gland tumor showing a score 3 of VEGFR-2 expression.

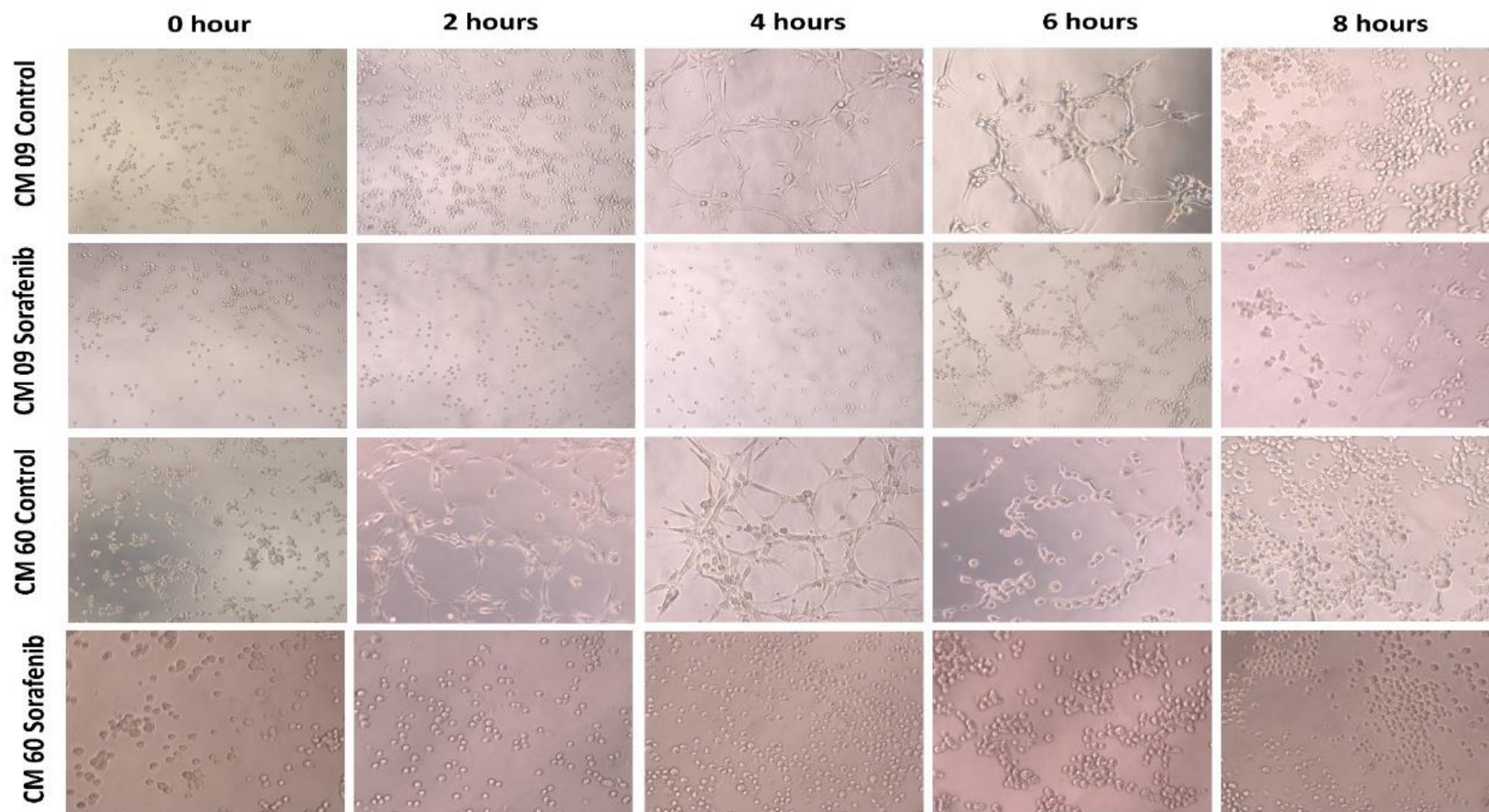


Figure 4. Evaluation of in vitro vasculogenic mimicry by two canine mammary gland tumor cells (CM9 and CM60). It is possible to observe tubular-like structures in both cell line after 4 hours. With 6 hours, both cell lines started the tubules disruption, forming group of cells at 8 hours. Cell treated with sorafenib showed no tubular-like formation at 4 hours. The sorafenib treated cells group at 6 hours; however, did not form linked tubular formation

4. Discussion

This paper describes the correlation of VM with prognostic factors in female dogs harboring mammary gland tumors. Interestingly, dogs with tumors presenting positive VM formation presented a lower survival time, indicating VM as an independent prognostic factor in CMT. This feature can be evaluated in HE slides, bringing a new histological tool for prognosis in CMT. Previously, VM has been demonstrated in female dogs with mammary gland tumors (Clemente et al., 2010; Barreno et al., 2019). However, these previous studies have investigated VM only in inflammatory mammary carcinomas (Clemente et al., 2010, Barreno et al., 2019). Overall, VM was associated with high tumor grade and undifferentiated histological subtype. In other types of tumors, such as human hepatocellular carcinomas, VM was associated with tumor grade, invasion, metastasis and short survival time, indicating the presence of VM in more aggressive tumors (Sun et al., 2006). In human breast cancer (BC), VM was previously associated with worst patients' outcome and with trastuzumab resistance in HER-2 positive tumors (Hori et al., 2019). Thus, new studies evaluating VM might provide a new therapeutic perspective. Since dogs are considered a model for human BC study (Dos Anjos et al., 2019), dogs and human can have benefits in comparative oncology initiatives.

We identified by immunohistochemistry a strong correlation between VEGF-A and VEGFR-2 in the tumor samples. Besides that, our linear regression analysis demonstrated a dependency between VEGF-A and VEGFR-2 expression. Thus, it is an evidence that VEGFR-2 expression is dependent of VEGF-A expression by neoplastic cells. VEGFR-2 deregulation induces VM by autophagy (Wu et al., 2017), cancer stem cells activation (Yao et al., 2013) and hypoxia (Zhu et al., 2010). Our results indicated that both VEGF-A and VEGFR-2 have an association with VM formation and patients' overall survival. Since VEGFR-2 activation leads to induce vascular formation (Yao et al., 2013), its expression occurs in normal endothelial cells during physiological vasculogenesis. However, cancer cells also can express VEGFR-2 to promote intratumoral vessel formation. In human gliomas, VEGFR-2 was implied as a key protein for VM and poor prognosis for the patients. In dogs, VEGFR expression has been investigated in CMT (Santos et al., 2016, Diessler et al., 2017, Dos Anjos et al., 2019). However, no previous studies associated VM with VEGFR-2 expression. As previously demonstrated in human gliomas (Yao et al., 2013), we believed that VEGF-A/VEGFR-2 autocrine feed-forward loop could be implied in VM formation in CMT. Thus, we investigated in vitro the ability of a VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitor (sorafenib) to prevent VM in vitro.

To investigate cell viability after sorafenib treatment, we determined IC₅₀ using MTT assay. Interestingly, the IC₅₀ value for our CMT cell lines were lower than the previously literature for different human cancer cells (Kim et al., 2017, Zanotto-Filho, et al., 2018, Faranda et al., 2019, Mahmoud, et al, 2019). This result reinforces the use sorafenib in dogs with CMT as a preclinical model for human BC, and as a therapeutic option for dogs with more aggressive CMT. sorafenib toxicity and pharmacokinetics was previously investigated in dogs, demonstrating that sorafenib is safe for treating dogs with cancer (Foskett et al., 2017). Our cancer cells VM structures after four-hours assay and sorafenib

inhibited its formation. Thus, future clinical trials in dogs can elucidate whether sorafenib can be effective for dogs with tumors showing VM.

Several clinical trials have been performed to evaluate sorafenib efficiency in prolonging patients' survival, however, the results are controversial (Massarweh et al 2014, Gradishar 2013, Schwartzberg et al 2013, Baselga et al., 2012; Isaacs et al 2011). Overall, association of sorafenib with chemotherapy or endocrine therapy has provided clinical improvement for the patients. One important limitation of these previous studies is the inclusion criteria having only patients with advanced disease with no predictive marker selecting which patient will show benefits from therapy (Bront et al., 2017). In this scenario, our study is proposing that Breast cancer affected patients with histological evidence of VM in histopathological specimens, could present benefits with sorafenib treatment. However, prior using VM being predicative to sorafenib treatment, a clinical study in CMT-affect dogs is necessary to provide a stronger evidence of sorafenib use in clinical practice.

Since dogs with spontaneous canine mammary gland tumor can important model to human Breast cancer, it is important to performed clinical studies in owned dogs and wouldn't be ethical using Soranib in these dogs without a prior evidence that VM can be inhibited by sorafenib. Thus, our study is the first preclinical study to show an evidence that sorafenib can target cells with VM ability.

5. Conclusion

Our results strongly suggest VM as prognostic factor for female dogs with mammary gland tumors, related to shorter survival time. VM formation can be induced by *VEGFR* deregulation, opening a new perspective for treatment with specific inhibitors. We found that sorafenib inhibited VM in vitro, as well has had an antitumoral effect, indicating its use in future clinical trial involving dogs.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

MCMP, PFL, AFL-F and CEF-A conducted all in vitro experiments. SALM, GGG and CEF-A retrieved the paraffin blocks from the pathology service, performed immunohistochemistry experiments and conducted survival analysis. MCMP, RL-A and CEF-A contributed to experimental design, intellectual input, and interpreting data. MCMP and CEF-A wrote the manuscript and all authors revised the final version of this manuscript.

Funding

Two co-authors received scholarship from São Paulo State Research Foundation – FAPESP, grant numbers #2018/17109-9 and #2015/25400-7. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. We also would like to thank the research grant from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (#422139/2018-1).

6. References

Barreno L, Cáceres S, Alonso-Diez Á, Vicente-Montaña A, Garcia M L, Clemente M, et al. (2019) Vasculogenic mimicry-associated ultrastructural findings in human and canine inflammatory breast cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2019 Jul 30;19(1):750. doi: 10.1186/s12885-019-5955-z.

Baselga J, Segalla JG, Roché H, Del Giglio A, Pinczowski H, Ciruelos EM, Filho SC, Gómez P, Van Eyll B, Bermejo B, Llombart A, Garicochea B, Durán MÁ, Hoff PM, Espié M, de Moraes AA, Ribeiro RA, Mathias C, Gil Gil M, Ojeda B, Morales J, Kwon Ro S, Li S, Costa F. Sorafenib in combination with capecitabine: an oral regimen for patients with HER2-negative locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012 May 1;30(13):1484-91. doi: 10.1200/JCO.2011.36.7771.

Clemente M, Pérez-Alenza MD, Illera JC, Peña L, (2010) Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol.*; 47 (2): 265-274 . doi: 10.1177/0300985809353167.

Costa CD, Justo AA, Kobayashi PE, Story MM, Palmieri C, Laufer Amorim R, Fonseca-Alves CE. (2019). Characterization of OCT3/4, Nestin, NANOG, CD44 and CD24 as stem cell markers in canine prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 108:21-28. doi: 10.1016/j.biocel.2019.01.002.

Diessler ME, Castellano MC, Portiansky EL, Burns S, Idiart JR. (2017) Canine mammary carcinomas: influence of histological grade, vascular invasion, proliferation, microvessel density and VEGFR2 expression on lymph node status and survival time. *Vet Comp Oncol.*;15(2):450-461. doi: 10.1111/vco.12189.

Dos Anjos D. S., Vital A. F., Lainetti P. F., Leis-Filho A. F., Dalmolin F., Elias F, Calazans S. G. and Fonseca-Alves C. E. (2019) Deregulation of VEGFR-2 and PDGFR Expression and Microvascular Density in a Triple-Negative Model of Canine Malignant Mammary Tumors with Lymph Node or Lung Metastasis, *Veterinary Sciences*

Faranda T, Grossi I, Manganelli M, Marchina E, Baiocchi G, Portolani N, et al. (2019) Differential expression profiling of long non-coding RNA GAS5 and miR-126-3p in human cancer cells in response to sorafenib. *Sci Rep*. 24;9(1):9118. doi: 10.1038/s41598-019-45604-2.

Foskett A, Manley C, Naramore R, Gordon IK, Stewart BM, Khanna C. (2017) Tolerability of oral sorafenib in pet dogs with a diagnosis of cancer. *Vet Med (Auckl)* 8; 8: 97-102. Doi: 10.2147/VMRR.S149678.

Ge H e Luo H. (2018) Overview of advances in vasculogenic mimicry – a potential target for tumor therapy. *Cancer Manag Res.*: 2 ; 10 : 2429-2437. doi: 10.2147/CMAR.S164675. eCollection 2018.

Goldschmidt, M.; Peña, L.; Rasotto, R.; Zappuli, V. (2011) Classification and grading of canine mammary tumors, *Vet Pathol.* ;48(1):117-31. doi: 10.1177/0300985810393258.

Gradishar WJ, Kaklamani V, Sahoo TP, Lokanatha D, Raina V, Bondarde S, Jain M, Ro SK, Lokker NA, Schwartzberg L. A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b study evaluating sorafenib in combination with paclitaxel as a first-line therapy in patients with HER2-negative advanced breast cancer. *Eur J Cancer.* 2013 Jan;49(2):312-22. doi: 10.1016/j.ejca.2012.08.005.

Guo S, Colbert LS, Fuller M, Zhang Y, Gonzalez-Perez RR. (2010) Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochim Biophys Acta.*; 1806 (1): 108-121. Doi:10.1016/j.bbcan.2010.04.004. Epub 2010 11 de maio.

Hori A, Shimoda M, Naoi Y, Kagara N, Tanei T, Miyake T, et al (2019). Vasculogenic mimicry is associated with trastuzumab resistance of HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.*;21(1):88. doi: 10.1186/s13058-019-1167-3.

Isaacs C, Herbolzheimer P, Liu MC, Wilkinson M, Ottaviano Y, Chung GG, Warren R, Eng-Wong J, Cohen P, Smith KL, Creswell K, Novielli A, Slack R. Phase I/II study of sorafenib with anastrozole in patients with hormone receptor positive aromatase inhibitor resistant metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jan;125(1):137-43. doi: 10.1007/s10549-010-1226-z.

Kalathil SG, Hutson A, Barbi J, Iyer R, Thanavala Y. (2019) Augmentation of IFN- γ + CD8+ T cell responses correlates with survival of HCC patients on sorafenib therapy. *JCI Insight*;4(15). pii: 130116. doi: 10.1172/jci.insight.130116. eCollection 2019 Aug 8.

Karayannopoulou, M.; Kaldrymidou, E.; Constantinidis, T.C.; Dessiris, A. (2005) Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *J. Comp. Pathol.* 133(4), 246–252.

Kim LH, Shin JA, Jang B, Yang IH, Won DH, Jeong JH, et al (2017) Sorafenib potentiates ABT-737-induced apoptosis in human oral cancer cells. *Arch Oral Biol.*; 73:1-6. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.08.034.

Laineti PF, Brandi A, Leis-Filho, AF, Mangini MCP, Kobayashi PE, Laufer-Amorim P, Fonseca-Alves CE. Establishment and Characterization of canine mammary gland carcinoma cell lines with vasculogenic mimicry ability in vitro. *Vet Quart*, 2019.

Lee Y-Y, Chen K-F, Chou C-H, Lin C-S (2012), Abstract 4651: Sorafenib and its derivatives induce apoptosis and autophagy in canine mammary tumor cells. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2012-4651.

Liu Z-J-L, Zhou Y-J, Ding R-L, Xie F, Fu SZ, Wu J-B, et al. (2018) *In vitro* and *in vivo* apatinib inhibits vasculogenic mimicry in melanoma MUM-2B cells. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200845>

Massarweh S, Moss J, Wang C, Romond E, Slone S, Weiss H, Karabakhtsian RG, Napier D, Black EP. Impact of adding the multikinase inhibitor sorafenib to endocrine therapy in metastatic estrogen receptor-positive breast cancer. *Future Oncol.* 2014 Dec;10(15):2435-48. doi: 10.2217/fon.14.99.

Petrovic N. (2016) Targeting angiogenesis in cancer treatments: Where do we stand? *J Pharm Pharm Sci.* ;19(2):226-38. doi: 10.18433/jpps.v19i2.27608.

Qiqi Liu, Lili Qiao, Ning Liang, Jian Xie, Jingxin Zhang, Guodong Deng, Hui Luo, Jiandong Zhang. (2016) The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *J Cell Mol Med.*; 20(9): 1761–1769. Published online 2016 Mar 29. Doi: 10.1111/jcmm.12851PMCID: PMC4988285

Raoul JL, Gilabert M, Adhoute X, Edeline J., (2017) An in-depth review of chemical angiogenesis inhibitors for treating hepatocellular carcinoma., *Expert Opin Pharmacother.*;18(14):1467-1476. doi: 10.1080/14656566.2017.1378346. Epub 2017 Sep 14.

Salinas-Vera YM, Gallardo-Rincón D, García-Vázquez R, Hernández-de la Cruz ON, Marchat LA, González-Barrios JA, et al (2019) HypoxamiRs Profiling Identify miR-745 as a Regulator of the Early Stages of Vasculogenic Mimicry in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Front. Oncol.* 9:381. Doi: 10.3389/fonc.2019.00381

Santos A, Lopes C, Gärtner F, Matos AJ. (2016) VEGFR-2 expression in malignant tumours of the canine mammary gland: a prospective survival study. *Vet Comp Oncol.*;14(3):e83-92. doi: 10.1111/vco.12107.

Sorenmo, K.U.; Worley, D.R.; Goldschmidt, M.H. (2013) Tumors of the Mammary Gland. In Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, 5th ed.; Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L., Eds.; Elsevier: St Louis, MO, USA; pp. 538–556.

Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J, Guo H, Zhao X, et al (2006). Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.*;16(4):693-8.

Schwartzberg LS, Tauer KW, Hermann RC, Makari-Judson G, Isaacs C, Beck JT, Kaklamani V, Stepanski EJ, Rugo HS, Wang W, Bell-McGuinn K, Kirshner JJ, Eisenberg P, Emanuelson R, Keaton M, Levine E, Medgyesy DC, Qamar R, Starr A, Ro SK, Lokker NA, Hudis CA. Sorafenib or placebo with either gemcitabine or capecitabine in patients with HER-2-negative advanced breast cancer that progressed during or after bevacizumab. *Clin Cancer Res.* 2013 May 15;19(10):2745-54. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3177.

Yang, Tan; Ming, Xu; Jie, Liu; Wei, Wang; Guangliang, Huang; Manxia, Lin; et al. (2019) Ultrasound-Triggered Nanodroplets for Targeted Co-Delivery of Sorafenib/Doxorubicin for Hepatocellular Carcinoma Therapy, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol 15, n. 9, 1881-1896 (16) <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2823>

Yao X, Ping Y, Liu Y, Chen K, Yoshimura T, Liu M, et al (2013) Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) plays a key role in vasculogenic mimicry formation, neovascularization and tumor initiation by Glioma stem-like cells. *PLoS One*;8(3):e57188. doi: 10.1371 / journal.pone.0057188.

Wu HB, Yang S, Weng HY, Chen Q, Zhao XL, Fu WJ, et al (2017). Autophagy-induced KDR/VEGFR-2 activation promotes the formation of vasculogenic mimicry by glioma stem cells. *Autophagy*. 2;13(9):1528-1542. doi: 10.1080/15548627.2017.1336277.

Zanotto-Filho A, Rajamanickam S, Loranc E, Masamsetti VP, Gorthi A, Romero JC, et al. (2018) Sorafenib improves alkylating therapy by blocking induced inflammation, invasion and angiogenesis in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 1;425:101-115. Doi: 10.1016/j.canlet.2018.03.037.

Zhu YJ, Zheng B, Wang HY, Chen L. (2017) New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver 49ancer. *Acta Pharmacol Sin.*;38(5):614-622. Doi: 10.1038/aps.2017.5.