

30. Salud Animal

Inmunoexpresión del factor de transcripción HSF1 en tumores de mama en hembras caninas del Hospital Veterinario en Montevideo, Uruguay.

Alcaide, Fernanda; mfalcaidei@gmail.com; Alsina, Laura; lalsina@gmail.com; Camacho, Ana; anacamachobenitez@gmail.com; Jassid, Mariana; mjassid@gmail.com; Miscevicus, Noelia; miscevicus@gmail.com Orientadores: Lombide, Paula; plombide@gmail.com; Pedrana, Graciela; gpedrana@gmail.com; Viotti, Maria Helen; mahevic@gmail.com

Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Resumen

El factor de transcripción de shock térmico HSF1 se ha asociado con un mal pronóstico en cáncer de mama en mujeres, promoviendo la evasión de la apoptosis, senescencia y fenotipo metastásico. Asimismo, dicho factor aumenta en tumores positivos a estrógenos en humanos. Sin embargo, el rol de HSF1 en tumores mamarios en perras con o sin influencia estrogénica no ha sido aún dilucidado. El objetivo fue caracterizar la inmunoexpresión del factor HSF1 en tumores mamarios de hembras caninas (n=30) con o sin ovariectomía. Las muestras fueron fijadas en formaldehído, procesadas histológicamente para posterior realización de la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpo primario policlonal de ratón anti-HSF1. Se cuantificó el área inmunomarcada de HSF1 mediante ImageJ. Se analizaron los efectos del estatus hormonal (hembras ovariectomizadas o no ovariectomizadas) y ocurrencia del tumor (por primera vez o recidiva en glándula mamaria). El área inmunomarcada de HSF1 en hembras ovariectomizadas fue mayor en tumores primarios que en secundarios recidivantes ($p=0,004$). En tumores mamarios de hembras no ovariectomizadas la expresión de HSF1 fue menor en primarios que en recidivantes ($p=0,0002$). Los resultados indican que en hembras sin hormonas ováricas circulantes el control del crecimiento tumoral está vinculado a la acción de HSF1. Dicho factor regula la expresión de proteínas de shock térmico con acción anti-apoptótica, promoviendo la proliferación celular y evitando la muerte celular. Este estudio sienta las bases de la caracterización de la inmunoexpresión de tumores mamarios con posible acción terapéutica basadas en vacunas anti el factor HSF1.

Palabras clave: perra, cáncer mamario, shock-térmico

Introducción

Los carcinomas mamarios son las neoplasias más frecuentes diagnosticadas tanto en hembras caninas en medicina veterinaria como en mujeres a nivel nacional y mundial. Aproximadamente el 80 % de los tumores mamarios caninos son diagnosticados en perras mayores de 7 años. Alrededor del 30 % de los casos son carcinomas mamarios malignos (Badowska-Kozakiewicz & Malicka, 2012). Los principales factores de riesgo asociado con tumores mamarios caninos son edad del animal, afectación de los ganglios linfáticos centinelas, el tipo histológico del tumor (Sorenmo, Rasotto, Zappulli, & Goldschmidt, 2011) y el grado de diferenciación de malignidad histológico. En la casuística de tumores en el Centro Hospital Veterinario en Facultad de Veterinaria, Montevideo, los tumores de mama representan el 43,8% (Elgue, Piaggio, Amaral, & Pessina, 2012), habiendo similares registros en países de Europa (Zatloukal et al., 2005). La identificación de nuevos marcadores tumorales permite identificar a los pacientes con riesgo de tumores mamarios, predecir su pronóstico, evaluar posibles respuestas a frente a nuevas terapias y reducir por ende la mortalidad. Las proteínas de shock térmico o heat shock proteins (HSPs) juegan un rol esencial en las células, siendo expresados tanto en condiciones fisiológicas así como en condiciones fisiopatológicas. Las HSPs son altamente expresadas en tumores mamarios, siendo objeto de nuevas terapéuticas hoy en día. Su expresión está regulada por otras proteínas como el factor de transcripción de shock térmico 1 (HSF1) (Ciocca, Arrigo, & Calderwood, 2013). La elevación de la expresión de HSPs en carcinomas de mama considerados malignos, por proliferación de proteínas mutantes malformadas y oncoproteínas sobre expresadas, depende de dicho factor HSF1 (Wang, Lee, Witt, Thakkar, & Ince, 2015). La activación de HSF1 promueve la evasión de la apoptosis, la senescencia y el fenotipo metastásico (Calderwood & Gong, 2012). Asimismo, dicho factor aumenta en tumores positivos a estrógenos en humanos (Santagata & Hu, 2011). Por otra parte, estudios previos en ratones, determinaron que la eliminación del gen Hsf-1 inhibe las metástasis en animales con expresión de la proteína Her2neu (Xi, Hu, Buckhaults, Moskophidis, & Mivechi, 2012). Se ha determinado que una elevada expresión de HSF1 facilita la supervivencia y la metástasis de las células cancerosas al permitir su adaptación (Vihervaara & Sistonen, 2014). Asimismo se identificaron los sitios diana de HSF1 en genoma completo en líneas celulares de cáncer de mama humano con diferentes capacidades metastásicas, y también se mostró que la transcripción impulsada por HSF1 es profundamente diferente en células malignas en

comparación con células que están expuestas al estrés por calor (Mendillo et al., 2012). Sin embargo, el rol del factor HSF1 en la génesis de tumores mamarios en hembras caninas no ha sido aún dilucidado. Asimismo, hasta donde sabemos el rol del factor de shock térmico HSF1 en tumores de mama en perras con y sin influencia de hormonas ováricas no ha sido descrito, en casos de tumores primarios ni en recidivantes.

Objetivo general

Determinar la correlación de la inmunoexpresión del factor HSF1 con el estatus hormonal y la recidiva del tumor en glándula mamaria de hembras caninas

Objetivos específicos

1. Localizar la inmunomarcación del factor de shock térmico HSF1 en tumores mamarios de hembras caninas
2. Cuantificar la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores mamarios de hembras caninas
3. Correlacionar la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 de acuerdo al estatus hormonal (hembras castradas, ovariectomizadas) y la presencia de tumor primario o recidivante en glándula mamaria

Materiales y Métodos

Colecta de tumores mamarios

Se obtuvieron 30 tumores mamarios de hembras caninas, con diagnóstico de tumor mamario, cuya mastectomía fue realizada en el block quirúrgico del Centro Hospital Veterinario, de la Facultad de Veterinaria, en Montevideo, Uruguay.

Procesamiento histológico

Las muestras de tumor mamario (de 0,5 a 1 cm³) fueron fijadas por inmersión en formaldehído bufferado (pH 7,4) por 24 horas y luego deshidratadas sumergiendo las muestras en concentraciones crecientes de etanol (70°, 95°, 100°). Posteriormente se realizó la aclaramiento en cloroformo por 24 horas, y luego la impregnación e inclusión en 3 baños sucesivos de parafina líquida (Tissue-Tek VIP Processing Embedding Medium, Sakura Finetek U.S.A., INC, punto de fusión. 60°C), y posterior confección de bloques.

Microtomía

Se realizaron cortes de cada bloque de tumor de 5 μm de espesor con micrótopo (Leica Reichert Jung Biocut 2030, Wetzlar, Germany) para posterior técnica de inmunohistoquímica.

Técnica de inmunohistoquímica

Se procedió al desparafinado de los cortes histológicos sumergiéndolos en xilol por 15 minutos, y posterior hidratación sumergiéndolos en concentraciones decrecientes de etanol por 2 minutos cada uno (100°, 95°, 70°). Luego se realizó la recuperación antigénica por calor en microondas con solución buffer citrato 0,01 M pH 6.0 con Tween 20, durante 2 minutos a 100% de potencia. Luego se procedió a la inactivación de peroxidasas endógenas con peróxido de hidrógeno al 3% (H_2O_2) por 20 minutos. Para el bloqueo de uniones inespecíficas se colocó sobre la lámina suero normal al 10% (15 minutos). Luego se incubó con anticuerpo primario anti factor HSF1 en una dilución 1:100 (mouse polyclonal ab52813, Abcam). Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse, luego con el complejo enzimático estreptavidina-peroxidasa (30 minutos cada uno), y revelando la reacción con solución de cromógeno (diaminobencidina + peróxido de hidrógeno) por un 1 minuto y 30 segundos (Mouse specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ab64259, EEUU). La reacción de DAB se observó mediante microscopio óptico, cortando la reacción con agua corriente y luego destilada. Posteriormente se agregó Hematoxilina de Harris durante 2 minutos para la contra coloración. Luego se realizó deshidratación en concentraciones creciente de etanol (70°, 95°, 100°), el aclaramiento con xilol y posterior montaje con Entellan® (MERCK, Alemania). El control negativo de la técnica de inmunohistoquímica se realizó reemplazando el anticuerpo primario por suero normal de rata. Entre cada paso se realizaron lavados con solución buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4

Captura de imágenes de preparados de inmunohistoquímica

Se realizó la captura de imágenes mediante software DinoCapture (DinoCapture 2,0 software, AnMo Electronics Corporation, Taiwan), de cámara digital (Dino-Eyepiece, AM-423X, AnMo Electronics Corporation, Taiwan) conectada a un microscopio trinocular (Premiere Profesional, modelo MRP-5000, Manassas, EE.UU.). Se capturaron 40 imágenes por lámina a una magnificación de 400 aumentos.

Análisis de imágenes

En primer lugar, se realizó el análisis descriptivo de la localización del factor de shock térmico HSF1 a partir de las imágenes previamente capturadas, determinando la localización intracelular o intercelular y describiendo el tipo celular en cual se observó la inmunomarcación. En segundo lugar, se realizó el análisis cuantitativo de la inmunoexpresión de HSF1 determinando el área inmunomarcada (%) para dicho factor. Se utilizó el software de análisis

de imágenes ImageJ (ImageJ 1.43m, Wayne Rasband open Source, National Institutes of Health, EEUU, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), y se creó un programa (macro) automatizando la detección de coloración marrón (DAB positivo) mediante la Umbralización, segmentación, binarización.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico analizando la variable cuantitativa área inmunomarcada de HSF1 en los tumores mamarios teniendo en cuenta los siguientes factores o variables categóricas: a) estatus hormonal: hembras sin ovariectomía *versus* hembras con ovariectomía; b) ocurrencia del tumor mamario: primario (aparición por primera vez); secundario (recidiva en glándula mamaria). Se realizó el análisis de varianza, teniendo en cuenta en el modelo de análisis los efectos antes mencionados y sus interacciones. Se utilizó el programa Sistema SAS para Windows (v9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Los resultados fueron expresados como medias \pm eem, con un nivel de significación $P < 0,05$.

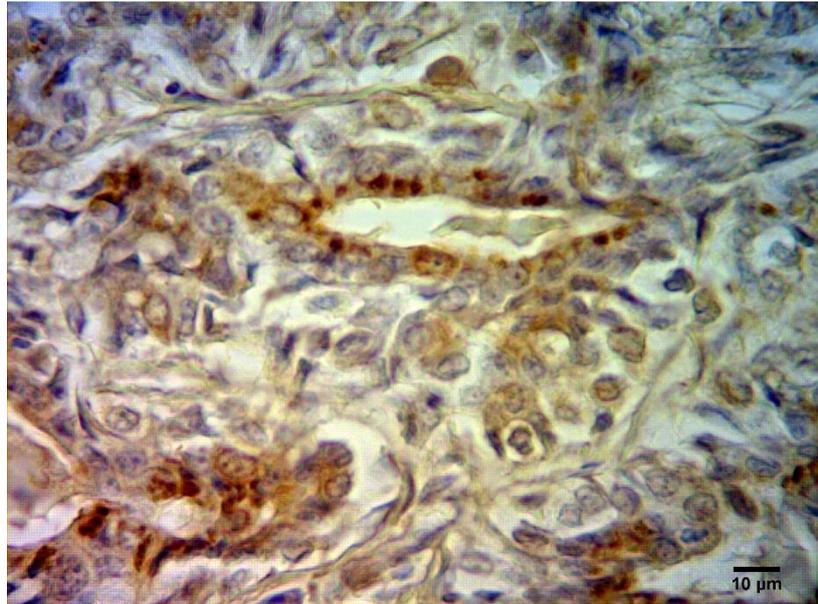
Resultados y Discusión

Análisis de la inmunolocalización del factor de shock térmico HSF1

La inmunolocalización del factor HSF1 se observó en el citoplasma de las células epiteliales de los conductos y en el citoplasma de las células conectivas del estroma (plasmocitos y macrófagos) (Figuras 1a y b).

Nuestros resultados evidencian la presencia de HSF1 en citoplasma tal como se determinó en estudios previos determinaron la expresión de HSF1 presente en el citoplasma en forma de molécula monomérica latente. Sin embargo, se ha visto se ha determinado que bajo condiciones de estrés el HSF1 se hiperfosforila por acción de las proteínas quinasas activadas por mitógenos, traslocándose en el núcleo (Dubey, Prajapati, Swamy, & Pachauri, 2015). La translocación al núcleo fue observada solo en escasas células de los tumores mamarios analizados en el presente estudio, y la mayoría se expresan a nivel citoplasmático, por lo que representaría una semejanza con la situación de estrés previamente descrito (Ver Figura 1.b).

a)



b)

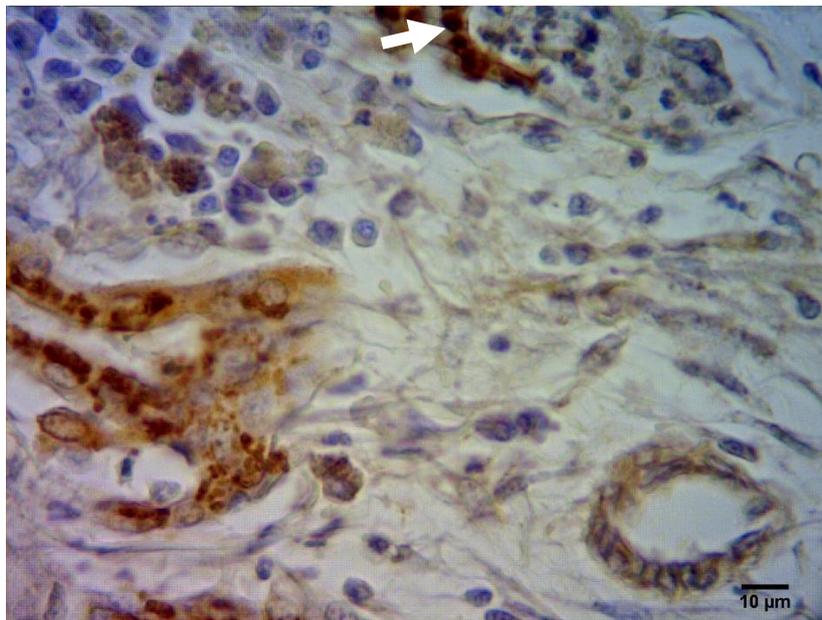


Figura 1. Imágenes de tumor de mama en hembras caninas con la técnica de inmunohistoquímica para la detección del factor de shock térmico HSF1. a) Inmunolocalización de HSF1 en citoplasma de intensa inmunomarcación en células epiteliales de conductos (flecha blanca) y leve inmunomarcación en células conectivas del estroma (flecha negra) en tumor de glándula mamaria. b) detección de localización intranuclear de HSF1 en células epiteliales (flecha blanca). Magnificación 400 aumentos. Barra de escala corresponde a 10 micrómetros.

Análisis cuantitativo de la Inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1

En primer lugar, considerando la interacción entre el estatus hormonal de hembras caninas ovariectomizadas (sin presencia de estrógenos circulantes) y la ocurrencia del tumor se determinó que el área inmunomarcada del factor HSF1 fue mayor en tumores primarios que en secundarios ($P = 0,004$).

Sin embargo, considerando la interacción entre el estatus hormonal en hembras caninas no ovariectomizadas (con presencia de estrógenos circulantes) y la ocurrencia del tumor, se determinó que el área inmunomarcada del factor HSF1 fue menor en primarios que en secundarios ($P = 0,0002$).

Por otra parte, considerando en la interacción de la ocurrencia de los tumores primarios con el estatus hormonal (con y sin ovariectomía) el área inmunomarcada fue mayor en hembras ovariectomizadas que en hembras sin ovariectomía ($P < 0,0001$). Sin embargo, si consideramos solo los secundarios, no se observaron diferencias ($P = 0,6$) en los tumores recidivantes entre hembras caninas con y sin ovariectomía (Figura 2).

Nuestros resultados indican que a pesar de la ovariectomía, las hembras con tumores primarios expresan más HSF1 que los tumores recidivantes. A pesar de que la ovariectomía reduce el riesgo de neoplasias mamarias (Ariyaratna et al., 2018), nuestros resultados indican que cuando se presenta la neoplasia en hembras ovariectomizadas puede ser agresivo y metastásico dado los niveles elevados de HSF1 que encontramos.

Estudios previos recomiendan realizar la ovariectomía luego de los 4 meses de edad, pero antes del primer ciclo estral, ya que luego aumentaría el riesgo de cáncer de mama (Spain, Scarlett, & Houpt, 2004).

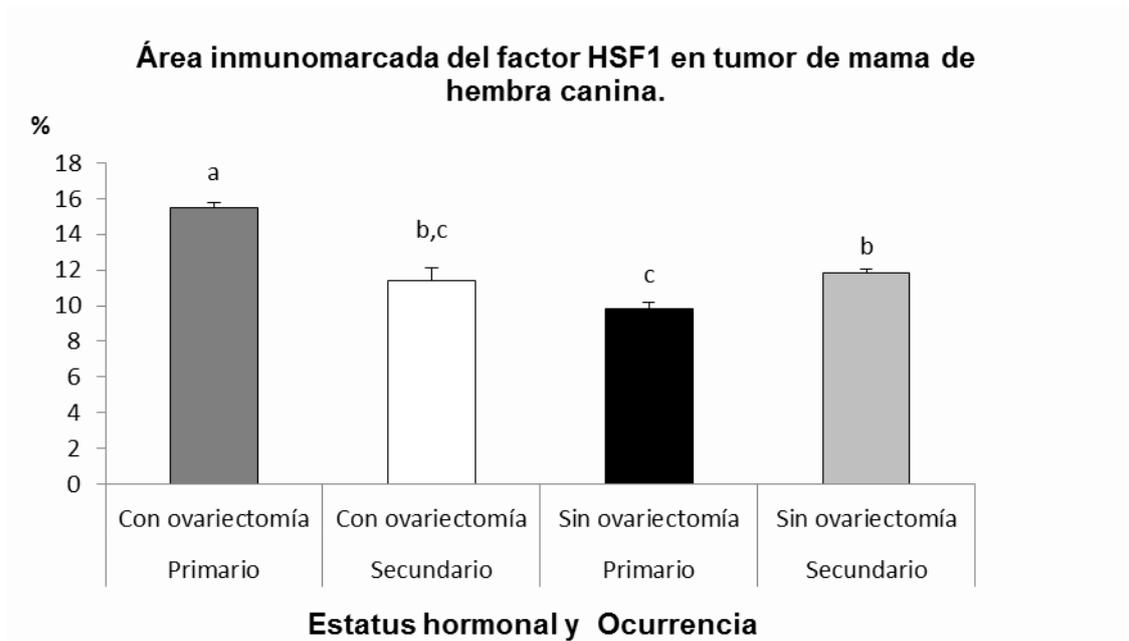


Figura 2. Área inmunomarcada del factor HSF1 en tumores de glándula mamaria en hembras caninas según el estatus hormonal y ocurrencia. Diferentes literales en las columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los grupos de hembras caninas categorizados según el estatus hormonal: con ovariectomía o sin ovariectomía; y según la ocurrencia del tumor en la glándula mamaria: primario (aparición por primera vez) o secundario (recidiva en glándula mamaria).

Este trabajo es el primero que se realizó, en el Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, para determinar la expresión del factor HSF1 en tumores de glándula mamaria y correlacionar dicha expresión con el estatus hormonal y ocurrencia del tumor en hembras caninas que ingresan a la consulta oncológica.

Los resultados indicaron que en hembras sin hormonas ováricas (con ovariectomía) circulantes el control del crecimiento tumoral está vinculado a la acción de HSF1. Dicho factor regula la expresión de proteínas de shock térmico con acción anti-apoptótica, promoviendo la proliferación celular y evitando la muerte celular.

Por lo tanto, HSF1 podría ser un nuevo objetivo terapéutico contra una variedad de tumores, incluyendo los tumores de mama. Se ha demostrado que varios inhibidores farmacológicos de la proteína quinasa C ejercen efectos inhibidores sobre la activación de HSF1 y, por lo tanto, inducen apoptosis en células tumorales (Kumar, Tomar, & Acharya, 2013).

Estudios previos muestran que HSF1 está sobreexpresado en una variedad de cánceres humanos, está asociado con la agresividad del cáncer y podría servir como un biomarcador independiente de diagnóstico o pronóstico. En general, HSF1 desempeña muchas funciones importantes en el cáncer mediante la regulación de la proliferación celular, la antiapoptosis, la transición epitelio-mesenquimal (EMT), la migración, la invasión y la metástasis, y puede ser un posible objetivo terapéutico para el cáncer (Jiang et al., 2015).

La importancia del factor regulador de las proteínas de shock térmico HSF1 radica en que dicho factor regulador forma parte de la maquinaria requerida para evitar la apoptosis celular, y mantener el fenotipo metastásico y senescencia a nivel tumoral. El aumento de la expresión en tumores mamarios de hembras caninas con recidivas es indicativo de un pronóstico reservado. Sin embargo, nuestros datos revelan que la expresión de HSF1 también es altamente expresado en tumores de mama en hembras caninas ovariectomizadas con tumor primario, con lo cual ese tumor tendrían alta chances de recidivar.

Conclusiones

En primer lugar, el presente estudio caracterizó la inmunoexpresión del factor de shock térmico HSF1 en tumores mamarios de hembras caninas, describiendo la localización a nivel tumoral en células epiteliales y células conjuntivas.

En segundo lugar, la vinculación de la elevada expresión HSF1 en los tumores de hembras caninas sin ovariectomía (por ende con estrógenos ováricos circulantes), y con recidiva, permite sospechar que existe un fenotipo agresivo y metastásico.

Sin embargo, es interesante destacar que las hembras castradas (ovariectomizadas), y con tumores primarios de mama, presentan mayor expresión de dicho factor de shock térmico. Por lo tanto, en los casos antes mencionados, el crecimiento tumoral no estaría vinculado al control hormonal por estrógenos, posiblemente generaría un crecimiento metastásico, evasión de apoptosis y aumento del crecimiento tumoral. Consecuentemente sería necesario realizar un seguimiento de dichos animales, hembras castradas con tumores primarios, dado la elevada expresión de HSF1 tienen altas posibilidades de generar un fenotipo metastásico, con evasión de apoptosis y progresión tumoral. En conclusión, la importancia de este estudio radica en que se caracterizó la inmunoexpresión de un posible factor pronóstico de metástasis en tumores mamarios en perras caninas. Este tipo de estudios inmunohistoquímicos a nivel

de la clínica veterinaria brinda información necesaria para la toma de decisiones cuando la expresión de HSF1 es elevada, y considerando a futuro la posibilidad de generar terapias basadas en vacunas anti factor HSF1.

Bibliografía

- Ariyaratna, H., de Silva, N., Aberdein, D., Kodikara, D., Jayasinghe, M., Adikari, R., & Munday, J. (2018). Clinicopathological Diversity of Canine Mammary Gland Tumors in Sri Lanka: A One-Year Survey on Cases Presented to Two Veterinary Practices. *Veterinary Sciences*, 5(2), 46. <http://doi.org/10.3390/vetsci5020046>
- Badowska-Kozakiewicz, A., & Malicka, E. (2012). Immunohistochemical evaluation of expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in mammary gland neoplasms in bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. <http://doi.org/10.2478/v10181-011-0135-3>
- Calderwood, S. K., & Gong, J. (2012). Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(4), 1096–1103. <http://doi.org/10.1002/jcb.23461>
- Ciocca, D. R., Arrigo, A. P., & Calderwood, S. K. (2013). Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Archives of Toxicology*, 87(1), 19–48. <http://doi.org/10.1007/s00204-012-0918-z>
- Dubey, A., Prajapati, K. S., Swamy, M., & Pachauri, V. (2015). Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Veterinary World*, 8(1), 46–51. <http://doi.org/10.14202/vetworld.2015.46-51>
- Elgue, V., Piaggio, J., Amaral, C., & Pessina, P. (2012). Factores asociados a la presentación del tipo de cáncer en caninos atendidos en el Hospital de la Facultad de Veterinaria de Uruguay Factors Associated With the Presentation of the Type of Cancer in Dogs Assisted in the Hospital of the Faculty of Veterina. *Veterinaria (Montevideo)*, 48(187), 25–30.
- Jiang, S., Tu, K., Fu, Q., Schmitt, D. C., Zhou, L., Lu, N., & Zhao, Y. (2015). Multifaceted roles of HSF1 in cancer. *Tumor Biology*, 36(7), 4923–4931. <http://doi.org/10.1007/s13277-015-3674-x>
- Kumar, S., Tomar, M. S., & Acharya, A. (2013). HSF1-mediated regulation of tumor cell apoptosis: a novel target for cancer therapeutics. *Future Oncology*, 9(10), 1573–1586. <http://doi.org/10.2217/fon.13.106>
- Mendillo, M. L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G. W., Hu, R., Tamimi, R. M., ... Lindquist, S. (2012). HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly

- malignant human cancers. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031>
- Santagata, S., & Hu, R. (2011). High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <http://doi.org/10.1073/pnas.1115031108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1115031108>
- Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48(1), 85–97. <http://doi.org/10.1177/0300985810389480>
- Spain, C. V., Scarlett, J. M., & Houpt, K. A. (2004). Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(3), 380–387. <http://doi.org/10.2460/javma.2004.224.380>
- Vihervaara, A., & Sistonen, L. (2014). HSF1 at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(2), 261–266. <http://doi.org/10.1242/jcs.132605>
- Wang, B., Lee, C.-W., Witt, A., Thakkar, A., & Ince, T. A. (2015). Heat shock factor 1 induces cancer stem cell phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*, 153(1), 57–66. <http://doi.org/10.1007/s10549-015-3521-1>
- Xi, C., Hu, Y., Buckhaults, P., Moskophidis, D., & Mivechi, N. F. (2012). Heat shock factor Hsf1 cooperates with ErbB2 (Her2/Neu) protein to promote mammary tumorigenesis and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.377481>
- Zatloukal, J., Lorenzová, J., Tichý, F., Nečas, A., Kecová, H., & Kohout, P. (2005). Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours. *Acta Veterinaria Brno*, 74(1), 103–109. <http://doi.org/10.2754/avb200574010103>

Financiamiento

Este trabajo fue parte de un proyecto financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica. Universidad de la República. Proyecto de Iniciación a la Investigación: “Caracterización de las proteínas de shock térmico, apoptóticas y de proliferación celular en tumores mamarios de hembras caninas.” ID 342.

Agradecimientos

Al equipo de cirugía del Centro Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria que nos brindaron las muestras de tumores de mama inmediatamente después de efectuada la cirugía.

