



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

MESTRADO

**POTENCIAL BIOMARCADOR DA PROTEÓLISE DE VERSICAN NO CÂNCER DE
MAMA: UM ESTUDO EM MODELO CANINO**

MARIA CAROLINA SANTOS DE SOUZA

Salvador – Bahia

2021

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**POTENCIAL BIOMARCADOR DA PROTEÓLISE DE VERSICAN NO CÂNCER DE
MAMA: UM ESTUDO EM MODELO CANINO**

MARIA CAROLINA SANTOS DE SOUZA

Orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

Coorientador: Dr. Sérgio Arruda

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para
a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S726p Souza, Maria Carolina Santos de.
Potencial biomarcador da proteólise de versican no câncer de mama: um
estudo em modelo canino. / Maria Carolina Santos de Souza. - 2021.
103 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Dra. Karine Araújo Damasceno, Laboratório de Patologia
Experimental.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) -
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

Título. 1. Câncer de mama. 2. Matriz extracelular. 3. Degradação. 4. Inflamação. I.

CDU 618.19-006

“POTENCIAL BIOMARCADOR DA PROTEÓLISE DE VERSICAN NO CÂNCER DE MAMA: UM ESTUDO EM MODELO CANINO”.

MARIA CAROLINA SANTOS DE SOUZA

FOLHA DE APROVAÇÃO

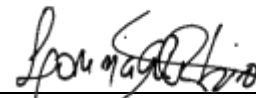
Salvador, 20 de janeiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.ª Dra. Alessandra Estrela Lima

Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima
Professora Associada
UFBA



Dra. Lorena Gabriela Rocha Ribeiro
Professora Adjuna
UFS



Juliana P.B.M. Fullam

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES)-

Código de Financiamento 001

Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz Bahia

Ao dono de toda ciência,

Yeshua

Ao meu alicerce e fonte de amor incondicional,

Irene, minha mãe.

Às Razões pelas quais trilhei esse caminho e hoje concluo o presente trabalho,

Medicina Veterinária e os animais

AGRADECIMENTOS

A Cristo que com sua Graça me deu forças para concluir essa pesquisa, me presenteando com a chance de conhecer um pouco mais da sua inigualável criação;

À dona Irene, mais conhecida como “Mainha”, por ser meu maior referencial e estímulo diário, pela força e ânimo transmitidos a cada etapa e por abrir mão de conquistas pessoais para que eu pudesse me dedicar exclusivamente à mais alguns anos de estudo. Muito obrigada, mainha! Sem a senhora nada disso seria possível;

Aos meus familiares e amigos por torcerem por mim, emanando boas energias, amor e orações que, sem dúvidas, me impulsionam em cada passo adiante;

À minha orientadora, Dra. Karine Araújo Damasceno, por acreditar em mim como profissional e como pessoa, por me guiar a cada etapa, por compartilhar comigo seu conhecimento e pela chance de aprender as inúmeras técnicas executadas até aqui, me dando autonomia e a chance de ser uma veterinária e pesquisadora cada dia mais completa. Minha eterna gratidão a senhora, dra. Jamais esquecerei tudo o que vivi e aprendi durante o mestrado;

Ao meu coorientador, Dr. Sérgio Arruda, pela confiança e pela chance de desenvolver esse trabalho;

Ao Dr. Thiago Marconi, frequente colaborador do nosso projeto que com toda dedicação nos ajudou nos experimentos com citometria de fluxo. Muitíssimo obrigada por toda disponibilidade e dedicação ao nosso trabalho e também pelas palavras de estímulo e encorajamento diante das intercorrências ao longo do estudo;

À Samantha Figueredo, minha companheira de laboratório, de seminários da pós-graduação e dos lanches em “Sr. Vinhas” entre as aulas e experimentos. Obrigada Samantha por todo conhecimento compartilhado, apoio emocional nos momentos difíceis e pelo companheirismo desenvolvido ao longo do trabalho;

Ao grupo GOC: Bruno, Simone, Laiane e Maria Paula pelo apoio diário e por tornar os dias no laboratório ainda mais leves e divertidos;

Ao Hospital Veterinário da UFBA, especialmente a Prof. Dra. Alessandra Estrela e as médicas veterinárias Sheila Amorim e Lais Pereira pela concessão das amostras, acesso às instalações do hospital, bem como atualização dos prontuários médicos e informações a respeito das pacientes caninas em estudo. Muitíssimo obrigada ao Projeto Mama!

Ao grupo GGSO pelos anos de aprendizado, lições e companheirismo. Marcus, Matheus, Paula Dantas, Bárbara, Jéssica, Naiara, Cris, Dona Livinha, Catiule e Dr. Geraldo, serei eternamente grata por tudo o que passamos juntos no LPBI;

A todos os servidores do IGM pelo cuidado e disponibilidade para treinar e dar assistência a cada estudante de pós-graduação sempre atentos às nossas necessidades e sempre dispostos a nos ajudar na resolução dos problemas que surgem ao longo do projeto. Agradeço a Lorena e Ana Paula (Serviço de Histotecnologia), Dra. Lúcia, Márcio, Arlene, Cláudio e Adriana (Plataforma de Microscopia Eletrônica) e Liliane (Plataforma de Citometria de Fluxo) pelo treinamento e autonomia para realização das técnicas;

Aos professores do PGBSMI por todo conhecimento compartilhado e pela valorização dos estudantes de pós-graduação nos mostrando a cada aula que também somos pesquisadores e contribuimos para o avanço da ciência em nosso país;

À Biblioteca do IGM pelo apoio prestado na finalização do presente estudo;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e suporte no período de pandemia;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão desse trabalho,

Minha sincera gratidão!

*"Nada prepara ou ensina com tanto poder como o amor.
O amor não constrange, atrai."*

Elisabeth Elliot

SOUZA, Maria Carolina Santos de. Potencial biomarcador da proteólise de versican no câncer de mama: um estudo em modelo canino. 2021. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é o responsável pelo maior número de mortes por câncer entre as mulheres em todo o mundo. De maneira semelhante, cães também são acometidos por neoplasias mamárias, das quais 50-90% são malignas, tornando as fêmeas caninas um importante modelo para o estudo do câncer de mama. Nesse contexto, o microambiente tumoral é uma fonte crucial de informações para melhor compreensão da progressão tumoral em ambas as espécies. Dentre os elementos desse microambiente, versican (VCAN), um proteoglicano de matriz extracelular, tem sido apontado como modulador da motilidade celular, perda de adesão e progressão tumoral. Uma vez abundante na MEC, VCAN está sujeito a regulação pela ação das enzimas ADAMTS. O papel da proteólise deste proteoglicano na imunomodulação tumoral ainda não foi elucidado, entretanto sugere-se que seu proteólito, a Versikina (VKINA), possa exercer importante papel imunomodulador na dinâmica tumoral. **OBJETIVO:** O presente estudo visa caracterizar a expressão de VKINA e investigar a relação entre a proteólise de VCAN, características clínico-patológicas e perfil inflamatório em modelo canino de câncer de mama. **METODOLOGIA:** Peripheral blood samples and breast specimens were collected from canine patients with mixed tumor carcinoma (MSC) or carcinosarcoma (CSS). Then, the immunohistochemical expression of versican, versikina, CD68, ADAMTS enzymes (-1, -5, -8, -9 and -15) was analyzed in the samples obtained. The evaluation of the inflammatory infiltrate took place by means of differential counting in HE (Hematoxylin-Eosin). In addition, a quantitative analysis method has been standardized for the evaluation of intratumoral collagen fibers using special stains, in order to morphologically characterize the extracellular matrix. **RESULTADOS:** A análise dos dados revelou que nos CTM, tanto VCAN quanto VKINA são mais expressos no estroma adjacente às áreas de invasão quando comparado com áreas *in situ*. VCAN foi mais expresso no grupo de cadelas com metástase e esteve mais sujeito a proteólise quando expresso em tumores de grau histológico III quando comparados ao grau I. A partir da análise da curva ROC, foi possível definir um *cutoff* de expressão de VKINA (escore 170) para diferenciar tumores quanto ao seu prognóstico, ou seja baixo e alto grau. Enzimas ADAMTS (5, 8 e 9) destacaram-se quanto à presença de VKINA e também se mostraram diferencialmente expressas em CTM e CSS. Houve também correlação entre a presença de macrófagos no infiltrado e a alta expressão de VKINA. O número de linfócitos em sangue periférico permaneceu maior no grupo que exibe alta expressão do proteólito. Quanto maior foi o infiltrado linfocítico, maior a presença de VKINA. **CONCLUSÃO:** Tais achados indicam que a superexpressão de VCAN está relacionada à agressividade destes tumores ao passo que o produto da sua proteólise (VKINA) está correlacionado a um maior infiltrado de linfócitos e macrófagos. Enzimas ADAMTS podem estar diretamente relacionadas ao comportamento biológico dos CTM e CSS mamários caninos. Os dados indicam, pela primeira vez em modelo espontâneo canino de câncer de mama, a participação da proteólise de VCAN e das enzimas ADAMTS no remodelamento da matriz extracelular e possível modulação da resposta imune, encorajando estudos mais robustos para melhor investigação dessas moléculas em tumores nas espécies canina e humana.

Palavras-chave: Matriz extracelular, Degradação, Invasão, Inflamação, Versikina, Câncer de mama.

SOUZA, Maria Carolina Santos de. Biomarker potential of versican proteolysis in breast cancer: a canine model study.2021. 103 f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021.

ABSTRACT

INTRODUÇÃO: Breast cancer is responsible for the highest number of cancer deaths among women in the world. Similarly, dogs are also affected by mammary cancer, 50-90% of which are malignant, making canine females an important model for the study of breast cancer. In this context, the tumor microenvironment is a crucial source of information for a better understanding of tumor progression in both species. Among the elements of this microenvironment, a proteoglycan with an extracellular matrix versican (VCAN) has been identified as a modulator of cell motility, loss of adhesion and tumor progression. Once abundant in MEC, VCAN is subject to regulation by the action of ADAMTS enzymes. The role of proteolysis of this proteoglycan in tumor immunomodulation has not yet been elucidated, however it has been suggested that its proteolyte, Versikina (VKINA), may play an important immunomodulatory role in tumor dynamics. **OBJECTIVE:** The present study aims to characterize VKINA expression and investigate the relationship between VCAN proteolysis, clinical-pathological characteristics and inflammatory profile in a canine model of breast cancer. **METHODOLOGY:** Peripheral blood samples and breast specimens were collected from canine patients with carcinomas in mixed tumors (CMT) or carcinosarcoma (CSS). In addition, a quantitative analysis method has been standardized for the assessment of intratumoral collagen fibers using special stains, in order to morphologically characterize the extracellular matrix. **RESULTS:** Data analysis revealed that in CMT, both VCAN and VKINA are more expressed in the stroma adjacent to the invasion areas when compared to in situ areas. VCAN was more expressed in the group of bitches with metastasis and was more subject to proteolysis when expressed in tumors of histological grade III when compared to grade I. From the analysis of the ROC curve, it was possible to define a cutoff in VKINA expression (score 170) to differentiate tumors in terms of their prognosis, that is, low and high grade. ADAMTS enzymes (5, 8 and 9) stood out as for the presence of VKINA and also if showed differentially expressed in CMT and CSS. There was also a correlation between the presence of macrophages in the infiltrate and the high expression of VKINA. The number of lymphocytes in peripheral blood remained higher in the group that exhibits high expression of the proteolyte. The greater the lymphocytic infiltrate, the greater the presence of VKINA. **CONCLUSION:** These findings indicate that the overexpression of VCAN is related to the aggressiveness of these tumors while the product of its proteolysis (VKINA) is correlated with a greater infiltrate of lymphocytes and macrophages. ADAMTS enzymes can be directly related to the biological behavior of canine mammary CMT and CSS. The data indicate, for the first time in the spontaneous canine model of breast cancer, the participation of VCAN proteolysis and ADAMTS enzymes in the remodeling of the extracellular matrix and possible modulation of the immune response, encouraging more robust studies for better investigation of these molecules in tumors in canine and human species.

Keywords: Extracellular matrix, Degradation, Invasion, Inflammation, Versikin, Breast Cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura e isoformas de Versican. Fonte: Adaptado de Binder <i>et al.</i> , 2017.....	25
Figura 2. Efeitos da proteólise de Versican descritos na literatura. Fonte: Modificando de Nandadasa; Foulcer; Apte, 2014.....	29
Figura 3 Expressão Imuno-histoquímica de Versican	44
Figura 4 Imunomarcção de VKINA em tumores mamários caninos	45
Figura 5 Versikina e fatores clínico-patológicos	46
Figura 6 Sensibilidade e especificidade de VKINA como marcador de grau histológico	48
Figura 7 Expressão de VCAN e VKINA em pacientes caninas com e sem metástase	49
Figura 8 Expressão Imuno-histoquímica das enzimas ADAMTS em CTM e CSS.....	55
Figura 9 Expressão das enzimas ADAMTS em células epiteliais e estroma	56
Figura 10 Expressão das enzimas ADAMTS em CTM e CSS.....	58
Figura 11 Colorações especiais.....	59
Figura 12 Correlação entre a expressão de VKINA e infiltrado de macrófagos.....	62
Figura 13 Relação entre a proteólise de VCAN e número de linfócitos tumorais.....	63
Figura 14 Sobrevida	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Anticorpos utilizados para análise Imuno-histoquímica.....	39
Tabela 2 Parâmetros clínico-patológicos Gerais	43
Tabela 3 Quantificação e classificação das fibras de colágeno em CTM e CSS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS	uma desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina
CCL2	Ligante de quimiocina 1
CD44	Glicoproteína de superfície celular
CK	Citoqueratina
cSf1	O fator estimulador de colônias 1
CSS	Carcinossarcoma
CTM	Carcinoma em tumor misto
DCIS	carcinoma ductal <i>in situ</i> (DCIS)
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ESR1	(receptor de estrógeno 1)
GAG	Glicosaminoglicanos
GM-CSF	O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HÁ	Ácido Hialurônico
HER- 2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPN	Índice de Prognóstico de Nottingham
Ki- 67	Proteína codificada pelo gene MKI67 associada a proliferação celular
MEC	Matriz extracelular
p63	Proteína codificada pelo gene TP63 com papel no desenvolvimento epidérmico
ROC	A Curva Característica de Operação do Receptor
SOCS	Supressor de sinalização de citocina
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TILs	Linfócitos Infiltrantes de tumor
UFBA	Universidade Federal da Bahia

VCAN Versican

VKINA Versikina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CÂNCER DE MAMA CANINO	18
2.1.1	Aspectos	
	 Gerais	18
2.1.2	Classificação histopatológica e fatores prognósticos dos tumores mamários caninos	20
2.1.3	Câncer de mama canino como modelo experimental espontâneo	21
2.2	MATRIZ EXTRACELULAR E CÂNCER	23
2.2.1	Componentes da matriz extracelular	23
2.2.1.1	<i>Versican</i>	24
2.2.2	Proteólise de versican	27
2.3	INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE MAMA	29
3.	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	34
4.	METODOLOGIA	35
4.1	ANIMAIS	35
4.2	COLHEITA	DAS
	AMOSTRAS	35
4.3	EXAMES COMPLEMENTARES	35
4.4	AVALIAÇÃO CLÍNICA	35
4.5	PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	36
4.5.1	Estadiamento clínico	36
4.5.2	Análise Histopatológica	36
4.5.3	Gradação Histológica	37
4.5.4	Índice prognóstico de Nottingham	38
4.6	IMUNO-HISTOQUÍMICA	38
4.7	COLORAÇÕES ESPECIAIS E HISTOMORFOMETRIA	39

4.8	ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TUMORAL E AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	40
4.10	ANÁLISE DE SOBREVIDA E ACOMPANHAMENTO	40
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5.	RESULTADOS	42
5.1	ANIMAIS E ESPÉCIMES MAMÁRIAS.....	42
5.2	PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS GERAIS.....	42
5.3	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA EM CTM E CSS E SUA CORRELAÇÃO COM GRAVIDADE E PROGNÓSTICO DA DOENÇA.....	44
5.3.1	Expressão imuno-histoquímica de VCAN em CTM e CSS	44
5.3.2	Caracterização do perfil de expressão de versikina em CTM e CSS	46
5.3.3	Sensibilidade e especificidade de VCAN e VKINA como marcadores prognósticos	49
5.4	DEGRADAÇÃO DA MEC: EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ADAMTS E ANÁLISE DE COLÁGENO EM CTM E CSS.....	53
5.4.1	Caracterização do perfil de expressão de enzimas ADAMTS 1, 5, 8, 9 e 15	53
5.4.2	Caracterização morfológica de colágeno na matriz extracelular tumoral e correlação com proteólise de VCAN	58
5.5	CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO TUMORAL E SUA CORRELAÇÃO COM A PROTEÓLISE DE VCAN.....	61
5.5.1	Avaliação do infiltrado de macrófagos	61
5.5.2	Avaliação do infiltrado de linfócitos intratumorais	62
5.6	SOBREVIDA.....	64
6.	DISCUSSÃO	66
7.	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE	93
	ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é atualmente o mais frequente tipo de neoplasia entre mulheres no mundo e, na população feminina brasileira, representa a primeira causa de morte por câncer, causando 17.572 mortes em 2018 e 66.280 novos casos em 2020 (equivalente a 29,7% dos casos de câncer em mulheres) (INCA,2020). Um elevado número de casos é também descrito em cadelas, única espécie com comparável prevalência de tumores de mama. Além disso, existem relatos na literatura acerca da semelhança, em diversos outros aspectos, entre tumores mamários humanos e caninos, tornando o tumor canino um interessante modelo no estudo de neoplasias mamárias, com rápida progressão da doença, trazendo avanços para ambas as espécies (QUEIROGA *et al.*, 2011; MOHAMMED *et al.*, 2020; DOEBAR *et al.*, 2019, FERREIRA *et al.*,2010).

Dentre as diversas linhas de pesquisa que envolvem o estudo do câncer, os estudos voltados para a análise do microambiente tumoral, em especial, a dinâmica da matriz extracelular (MEC) e seus componentes são responsáveis por dados promissores que podem ser peças chaves na busca por biomarcadores para diagnóstico precoce, prognóstico, novos alvos terapêuticos e melhor compreensão dos mecanismos de invasão e metástase tumoral em cadelas e mulheres (LIOTTA e KOHN, 2001; KISCHEL *et al.*, 2010; CANAVESE *et al.*, 2011; UNGEFROREN *et al.*, 2011; WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ,2018; NAJAFI; FARHOOD; MORTEZAEI, 2019).

Nesse aspecto, um componente da MEC, o proteoglicano versican (VCAN), tornou-se alvo de grande interesse entre os pesquisadores nas últimas décadas. Muitos estudos demonstraram que versican possui propriedades anti-adesivas, capacidade de modular proliferação, migração celular, angiogênese e também está relacionado ao potencial de invasividade de tumores malignos, colaborando assim para a progressão tumoral (RICCIARDELLI *et al.*, 2009; DAMASCENO *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2013; DAMASCENO *et al.*,2016a).

Além de versican ser capaz de interagir com células malignas, também está sujeito a regulação por algumas moléculas presentes na MEC, promovendo um microambiente pró-inflamatório. Uma vez que a inflamação é frequentemente associada com iniciação e promoção de câncer, células do sistema imune (especialmente linfócitos e macrófagos) podem ser consistentemente consideradas como mediadores críticos no desenvolvimento de tumores malignos. Os macrófagos são capazes de induzir a angiogênese, degradação e remodelamento da MEC e assim auxiliar na invasão de células neoplásicas (THEOCHARIS *et al.*, 2010). O

papel da resposta linfocítica associada ao tumor, por sua vez, ainda é considerada controversa, porém alguns trabalhos relatam que a presença de linfócitos no microambiente tumoral pode ser benéfica em várias neoplasias (DENARDO e COUSSENS, 2007; PAGÈS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2003).

No câncer de mama, o infiltrado linfocítico (de acordo com sua atividade e seu imunofenótipo) já é considerado um marcador prognóstico de melhor resposta a quimioterapias neoadjuvantes e maior sobrevida em mulheres, principalmente no tumor mamário triplo negativo e no HER-2 + (DENKERT *et al.*, 2010, 2018; DUSHYANTHEN *et al.*, 2015). Na espécie canina, a razão CD4+/CD8+ em sangue periférico tem um importante papel como fator prognóstico independente em carcinoma em tumor misto mamário (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, linfócitos, macrófagos, enzimas e células do estroma presentes na matriz rica em versican podem degradar a MEC e gerar fragmentos pró-inflamatórios capazes de direcionar a resposta imune. Várias proteases atuam na degradação do versican, incluindo as MMPs, plasmina e membros da família ADAMTS. A família das ADAMTS tem participação chave no remodelamento da MEC tumoral, principalmente em eventos associados a invasão e proliferação (BINDER *et al.*, 2017). Proteoglicanos, como o versican, são os maiores substratos da atividade proteolítica de membros dessa família. A clivagem do versican por enzimas da família ADAMTS1 gera um subproduto denominado Versikina, apontado como um bioativo (pró-apoptótico) durante a regressão interdigital de embriões de camundongo. Contudo, o papel da proteólise do versican na imunomodulação de macrófagos e outras células inflamatórias presentes no microambiente tumoral, bem como sua influência na degradação da MEC, ainda precisa ser melhor investigado (HOPE *et al.*, 2016).

Assim, propõe-se investigar a degradação de versican na matriz extracelular bem como sua relação com a presença de macrófagos e linfócitos em microambiente tumoral com neoplasias mamárias malignas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA CANINO

2.1.1 Aspectos Gerais

Nos últimos anos, um número cada vez mais frequente de cães recebem o diagnóstico de câncer. Isso acontece, dentre outros fatores, devido ao aumento da longevidade dos animais domésticos e graças aos importantes avanços na medicina veterinária que tem garantido o diagnóstico mais precoce de doenças graves (DOBSON *et al.*, 2019).

A melhor compreensão da biologia tumoral, prevenção e a implementação de terapias eficazes na oncologia veterinária canina vem sendo protagonista de diversos estudos ao redor do mundo, a fim de promover o bem-estar desses importantes membros das atuais famílias multiespécie e contribuir para estudos com câncer humano por meio da oncologia comparada (WATSON; FENG; ZHAO, 2019; DE BROT *et al.*, 2018; PINHO *et al.*, 2012; SALAS *et al.*, 2015; SIMPSON *et al.*, 2017).

Semelhantemente as mulheres, cadelas apresentam alta frequência de tumor de mama correspondendo a cerca de 50-70 % de todos os tipos tumorais dessa espécie (PASTOR *et al.*, 2018). Além disso, o percentual de neoplasias mamárias malignas em pacientes caninas é igual ou muito superior aos benignos, em média 50 % dos tumores possuem comportamento maligno. Porém, a ocorrência desses casos varia consideravelmente entre os países. No Brasil, por exemplo, os tumores mamários malignos variam de 50-90% (ITOH *et al.*, 2005; TORÍBIO *et al.*, 2012; SALAS *et al.*, 2015; RASOTTO *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2019).

Apesar da alta prevalência, a literatura atual conta com poucos estudos que avaliam a incidência dessa enfermidade na população canina. Schneider (1970) encontrou um risco de 145 casos a cada 100.000 fêmeas por ano na Califórnia, EUA, enquanto na Europa foi relatada uma incidência aproximada de 200 casos a cada 100.000 cadelas por ano (GRÜNTZIG *et al.*, 2016; VASCELLARI *et al.*, 2009). Países que adotam a ovariectomia precoce na rotina clínica veterinária apresentam menor incidência de câncer de mama canino (SLEECKX *et al.*, 2011). Além disso, apesar de não existirem dados que suportem consistentemente a predisposição racial ao desenvolvimento de câncer mamário (DALECK *et al.*, 1998; CAVALCANTI e CASSALI, 2006), alguns trabalhos indicam que Poodles, Dachshunds, Pointers, Retrievers e animais sem raça definida são os mais frequentemente

acometidos pelas lesões (MISDORP, 2002; CAVALCANTI, 2006; LANA *et al.*, 2007; TORÍBIO, 2008; LAVALLE *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; MELIN *et al.*, 2016).

A etiologia do câncer de mama permanece pouco conhecida tanto em fêmeas caninas quanto em humanas, porém, diversos fatores de risco como hormônio, genética e nutrição já foram identificados e são extensamente estudados (SUN *et al.*, 2017; PICK *et al.*, 1983; SCHNEIDER; RICHARD; TAYLOR, 1969; RUSSO e RUSSO, 1998; PHILIBERT *et al.*, 2003; SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004; SORENMO *et al.*, 2011; SORENMO; WORLEY; GOLDSCHMIDT, 2013). O risco de desenvolver neoplasias mamárias é maior entre cadelas de 9 a 11 anos (SORENMO *et al.*, 2013). Um dos mais importantes fatores de risco é a influência hormonal sofrida pela glândula. A administração progesteronas sintéticas, utilizados com fins anticoncepcionais na medicina veterinária, contribuem para o aumento da incidência de tumores de mama (RUTTEMAN 1992; SELMAN *et al.*, 1995; STOVING *et al.*, 1997). Em 2005, um estudo de Queiroga e colaboradores demonstrou que níveis séricos e teciduais de hormônios esteroides foram mais elevados em cadelas com tumores malignos comparados aos níveis dos mesmos hormônios em cadelas com lesões benignas, sugerindo uma influência desses esteroides na progressão tumoral através do efeito proliferativo gerado no epitélio que, por sua vez, pode induzir condições para o desenvolvimento da neoplasia. Dada a influência hormonal, a ovariectomia torna-se um importante método de prevenção desses tumores em cadelas (SANTOS *et al.*, 2020).

Fatores genéticos também contribuem diretamente para a ocorrência de tumores caninos. Pesquisas apontam que assim como em humanos, mutação e superexpressão de determinados genes pode predispor o desenvolvimento de tumores mamários em cadelas e estar relacionada com os diferentes prognósticos da doença. Dentre esses genes, estão o proto-oncogene *c-erbB-2* que codifica uma proteína transmembrana denominada HER-2 (DAMASCENO *et al.*, 2016; FAZEKAS *et al.*, 2016), *p53* (ABDELMEGEED e MOHAMMED, 2018; MUNDAY *et al.*, 2019), *BRCA1*, *BRCA 2* (THUMSER-HENNER; NYTKO; BLEY, 2020; IM *et al.*, 2013; NIETO *et al.*, 2003; RIVERA *et al.*, 2009;), *CDH1*, *BRIP* e *PTEN* (BORGE *et al.*, 2011; GOEBEL e MERNER, 2017).

Em adição aos genes mais comumente explorados, novos genes têm surgido como potenciais marcadores prognósticos e preditivos em tumores mamários caninos. Em 2013, um grupo demonstrou que o gene *ESR1* (receptor de estrógeno 1) está associado ao desenvolvimento de neoplasias mamárias (SVERDRUP BORGE *et al.*, 2013). Mais recentemente, uma pesquisa com cães Springer Spaniel inglês sugeriu que o gene *CDK5RAP2* pode estar relacionado ao desenvolvimento de NMC por codificar uma proteína de igual nome

com função na regulação do ciclo celular e provável impacto na resposta ao tratamento quimioterápico (MELIN *et al.*, 2016). O gene *NET 1* codifica proteína associada a comportamento maligno e tem sido considerado um potencial marcador prognóstico em cadelas com câncer de mama (ARGANO *et al.*, 2019).

Com relação aos fatores nutricionais envolvidos, destaca-se a obesidade canina. O excesso de tecido adiposo pode afetar o curso da doença por influenciar na secreção de importantes citocinas e hormônios. Lim e colaboradores (2013), ao avaliarem padrões de expressão de moléculas ligadas à obesidade e score corporal de cadelas com carcinomas mamários caninos, perceberam que cadelas com sobrepeso exibiam a doença mais precocemente e apresentavam maior proporção de tumores grau III e maior expressão de aromatase e receptores hormonais (LIM *et al.*, 2015; SHIN *et al.*, 2016; SORENMO *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2019). Cadelas com carcinomas mamários e sobrepeso apresentaram hiperresistinemia (aumento da de resistina, uma adipocitocina) e maior expressão de Ki-67 segundo uma pesquisa recentemente publicada por NICCHIO e colaboradores (2020).

2.1.2 Classificação histopatológica e fatores prognósticos dos tumores mamários caninos

Devido a heterogeneidade morfológica e biológica das neoplasias mamárias caninas, ao longo do tempo, foram propostas diferentes classificações desses tumores partindo de suas características histopatológicas. A Organização Mundial da Saúde, em 1974, publicou a *International Histological Classification Of Tumours Of Domestic Animals* e, somente 25 anos depois, uma revisão dessa publicação foi realizada (AFIP; MISDORP *et al.* 1999). Duas novas classificações surgiram posteriormente agregando outros subtipos histológicos às propostas iniciais (CASSALI *et al.*, 2011; GOLDSCHMIDT *et al.*, 2011).

O *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* realizado no Brasil por Cassali e colaboradores (2011) adotou novos subtipos não propostos por Misdorp *et al.* (1999), são eles as lesões não neoplásicas e os carcinomas micropapilares. Em 2013, um novo consenso foi elaborado, trazendo algumas alterações a exemplo da exclusão da nomenclatura dos subtipos complexos, adenoma e carcinoma complexo, além da adição dos termos adenomioepitelioma benigno e maligno (CASSALI *et al.*, 2014).

Além da classificação histológica, ao longo dos anos as pacientes caninas com câncer de mama também se beneficiaram com sistemas de estadiamento, além de marcadores preditivos e prognósticos implementados na medicina veterinária a fim de situar em qual

estágio da progressão tumoral a paciente canina se encontra, direcionando assim, medidas terapêuticas como também ocorre na rotina do câncer de mama humano. O sistema TNM, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para animais domésticos (OWEN, 1980), visa o estadiamento clínico das pacientes com câncer de mama, levando em consideração o tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástases à distância ou em linfonodos distantes à glândula mamária (M). Outro importante componente da análise dos tumores mamários caninos é a graduação histológica, adaptado de ELSTON & ELLIS, 1991. Em caninos, Karayannopoulou e colaboradores em 2005, avaliaram 85 carcinomas mamários e observaram uma relação entre o grau histológico e a sobrevida dos indivíduos. Segundo o grupo, cadelas com neoplasias de grau III apresentaram um risco de morte 21 vezes maior comparadas às cadelas com tumores grau I ou II. De acordo com Dutra e colaboradores em 2008, o grau histológico e a contagem mitótica são bons fatores prognósticos independentemente.

Tumores mamários caninos e humanos compartilham grande parte dos marcadores tumorais. Dentre eles estão os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) (CHANG *et al.*, 2009; MOHR *et al.*, 2016; SPOERRI *et al.*, 2015); o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, também chamado de c-erbB-1 ou HER1); o HER-2 (ou c-erbB-2); o índice de proliferação celular obtido por marcadores envolvidos no ciclo celular como o ki67 e o PCNA (Antígeno de proliferação celular) (CASSALI *et al.*, 2014), as citoqueratinas, como a CK 5/6, cuja expressão em neoplasias mamárias está associada ao fenótipo basal e comportamento biológico mais agressivo (SASSI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2014) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) que atualmente é correlacionada com alto grau histológico e menor sobrevida (LAVALLE *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2016).

2.1.3 Câncer de mama canino como modelo experimental espontâneo

O câncer de mama canino e humano se assemelham em muitos aspectos, incluindo a história natural, complexidade genética, heterogeneidade, resposta terapêutica, características moleculares e de imagem, bem como desenvolvimento de metástase à distância (STRANDBERG E GOODMAN, 1974; MISDORP E HART, 1976; GOURLEY e ALENZA, 2000; VAIL e MACEWEN, 2000; SASSI *et al.*, 2010; QUEIROGA *et al.*, 2011; WATSON; FENG; ZHAO, 2019). O aspecto histológico também é comparável entre as duas espécies, incluindo estágios pré-invasivos de alguns tipos tumorais nos quais lesões pré-invasivas, como hiperplasia ductal atípica e carcinoma ductal *in situ* (DCIS), desenvolvem-se

espontaneamente na glândula mamária canina (FERREIRA *et al.*, 2010; DOEBAR *et al.*, 2019; MOHAMMED *et al.*, 2020). Além disso, cães e humanos compartilham os mesmos fatores de riscos para neoplasias, dentre eles obesidade, dieta, idade avançada, tratamento com progesterona e mutações em diversos genes incluindo genes BRCA, como citado anteriormente (MOHAMMED *et al.*, 2020).

Diante disso, o modelo de câncer canino vem sendo investigado comparativamente sob vários aspectos incluindo, os tipos histológicos, perfil molecular e comportamento clínico, a exemplo dos carcinomas simples descritos como modelos para o câncer de mama *basal like* humano (WATSON; FENG; ZHAO, 2019) e do carcinoma inflamatório para estudo comparativo da neoplasia humana de igual nomenclatura (RAPOSO *et al.*, 2017). Em um estudo publicado recentemente Mohammed e colaboradores (2020) defendem o carcinoma ductal *in situ* canino como excelente modelo para o estudo DCIS humano e sua progressão para forma invasiva.

O carcinoma em tumor misto (CTM) é o tipo histológico mais frequente na rotina médico-veterinária representando cerca de 42- 56,7% das neoplasias malignas (TORÍBIO *et al.*, 2008; CASSALI *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2014). Microscopicamente, os CTMs são caracterizados pela proliferação de células epiteliais malignas, além dos elementos mioepiteliais e mesenquimais benignos, com formação de cartilagem, osso ou ambos, os quais podem ser exibidos em combinação com tecido fibroso mixóide e tecido adiposo. A literatura sugere que a progressão do CTM pode dar origem ao carcinossarcoma (CSS). Morfologicamente, o CSS é muito semelhante ao CTM, porém além do componente epitelial, ele apresenta proliferação de células mesenquimais malignas. Nestes tumores, a proliferação carcinomatosa pode exibir crescimento *in situ* ou infiltrativo (CASSALI *et al.*, 2017). Apesar das semelhanças, CTM e CSS tem prognósticos bem distintos, onde o CTM está associado a uma maior sobrevida e melhor resposta a quimioterapia que CSS (CASSALI *et al.*, 2017).

CTMs caninos se assemelham aos carcinomas ex-adenomas pleomórficos da glândula salivar humana e também aos carcinomas mamários produtores de matriz da mulher. Quanto aos carcinossarcomas, sua clínica e características patológicas são semelhantes ao próprio carcinossarcoma (também chamado de carcinoma metaplásico) descrito em humanos. Estes são tumores raros em mulheres e mostram um prognóstico pior do que os carcinomas (NAHOMI *et al.*, 2005).

Além das semelhanças supracitadas, a alta prevalência e a rápida progressão das neoplasias mamárias em cães, justifica o crescente interesse dos pesquisadores pelo modelo canino. Uva e colaboradores em 2009 mostraram que a relação transcricional entre assinaturas

gênicas observadas no câncer mamário humano é largamente mantida no modelo canino, sugerindo uma grande similaridade na dinâmica do câncer entre as espécies. Dessa forma, a oncologia mamária comparada pode auxiliar fortemente no melhor entendimento da biologia tumoral, no desenvolvimento de novas terapias, ensaios pré-clínicos mais eficazes, pesquisa de novos marcadores prognósticos e de diagnóstico, trazendo avanços e benefícios para ambas as espécies.

2.2 MATRIZ EXTRACELULAR E CÂNCER

2.2.1 Componentes da matriz extracelular

A iniciação, promoção e progressão do câncer são processos que envolvem complexas etapas afetadas tanto pelas características das células neoplásicas quanto pelo microambiente tumoral. A MEC, um dos elementos deste microambiente, tem um importante papel no desenvolvimento do câncer. Especialmente durante a invasão, pré-requisito crucial para a metástase, a matriz desempenha o importante papel ao criar um microambiente favorável à migração das células neoplásicas (LIOTTA e KOHN, 2001; RICCIARDELLI *et al.*, 2009; KISCHEL *et al.*, 2010; CANAVESE *et al.*, 2011; UNGEFROREN *et al.*, 2011). Além disso, as alterações sofridas pela MEC interferem direta ou indiretamente em outros pontos críticos da progressão tumoral, tais como durante a proliferação, angiogênese, desregulação energética, inflamação e evasão da resposta imune (POLYAK, 2008; DU; YANG; YEE, 2013; PICKUP *et al.*, 2014).

Em condições fisiológicas, a matriz extracelular é constituída pelas células tipo fibroblastos e miofibroblastos, além dos elementos tais como glicoproteínas fibrosas (a exemplo do colágeno e elastina), ácido hialurônico e proteoglicanos. Estes componentes se organizam em membrana basal e matriz intersticial, estruturas responsáveis pela sustentação e manutenção da arquitetura tecidual. Contudo, a MEC não se restringe apenas à função arcabouço, mas também gera e participa de vias bioquímicas e biomecânicas críticas para as atividades celulares, tanto em condições normais quanto em processos patológicos (WALKER *et al.*, 2018).

Dentre os componentes da MEC, o colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular e tem sido descrito por numerosos estudos como um elemento de papel crítico na regulação da proliferação e progressão, partindo de sua capacidade de fornecer sinais físicos,

bioquímicos e biomecânicos para células tumorais e não tumorais (MALLER *et al.*, 2013). Um exemplo prático dessa importância está no aumento da densidade mamográfica, um dos fatores de risco mais conhecidos para neoplasias mamárias, e está associado com a abundância de tecido fibroglandular rico em colágeno (BRISSON *et al.*, 2015; CASE *et al.*, 2017; KLATT *et al.*, 2009). Além disso, é crescente o número de pesquisas indicando que assinaturas específicas de colágeno associadas a tumores podem prever a recorrência de câncer mamário em modelos murinos, em cadelas e mulheres (BRISSON *et al.*, 2015; CASE *et al.*, 2017; CONKLIN e KEELY, 2012; MALLER *et al.*, 2013), reforçando a importância da avaliação desse constituinte em tumores mamários.

Outro grupo importante de moléculas que compõem a MEC estão vinculados a dinâmica tumoral, são eles os proteoglicanos, um grupo heterogêneo de proteínas caracterizadas pelo seu conteúdo de glicosaminoglicano (BOSMAN e STAMENKOVIC, 2003; STANTON *et al.*, 2011). Atualmente, quatro classes de glicosaminoglicanos (GAGs) estão envolvidas no contexto da progressão tumoral: sulfato de heparano (HS), sulfato de condroitina (CS), sulfato de queratano (KS) e hialuronano (HA).

2.2.2 Versican

Os proteoglicanos de sulfato de condroitina, pertencentes a família dos hialectanos, são responsáveis por manter a estrutura da MEC hidratada, e por isso são importantes para os eventos de remodelamento tecidual. Dentre eles, destaca-se o VCAN. Este tem importante papel nos eventos relacionados à progressão tumoral, como na perda de adesão celular, migração, proliferação e angiogênese (WIGHT, 2002a).

Versican foi identificado pela primeira vez por Zimmermann e Ruoslahti (1989), quando estes pesquisadores descreveram a sequência de cDNA que codificava um proteoglicano em fibroblastos. Estes autores denominaram essa molécula Versican, palavra oriunda da junção de “Versátil” e “proteoglicano”, devido a sua estrutura em mosaico complexa e a combinação das características amino-terminal, carboxiterminal junto aos glicosaminoglicanos (GAGs), o que confere alta interatividade e versatilidade a este hialectano (WIGHT, 2002b; ZIMMERMANN e RUOSLAHTI, 1989).

Estruturalmente, VCAN é formado por domínios globulares N-terminal globular, C-terminal e uma região central de GAGs. A região N-terminal, denominada domínio G1, consiste no sítio de ligação ao ácido Hialurônico, um motivo semelhante a imunoglobulina com sequências de ligação que auxiliam a interação do HA com CD44. O domínio G3 contém

duas repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF), um motivo tipo lectina e uma região de ligação ao complemento, conforme ilustrado na Figura 1 (ZIMMERMANN E RUOSLAHTI, 1989). Mudanças na região GAG dão origem a diferentes isoformas de VCAN por meio de *splincing* alternativo. Até o momento, são conhecidas cinco isoformas, sendo elas o VCAN completo (V0) e as variantes V1, V2, V3 e V4 (WIGHT, 2002a) (Figura 1).

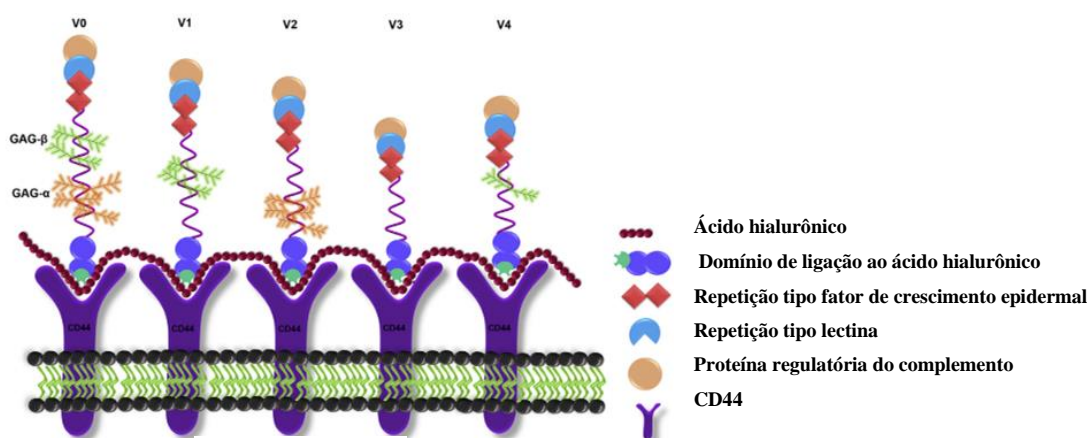


Figura 1. Estrutura e isoformas de Versican. Fonte: Adaptado de Binder *et al.*, 2017.

No microambiente tumoral, VCAN pode estar hiperegulado em diversos tipos tumorais, dentre eles mieloma maligno, glioblastoma, cânceres de próstata, mama, ovário, gástrico, laríngeo, pancreático, células germinativas testiculares e cervical, despertando assim o interesse da comunidade científica com foco em oncologia (KEIRE *et al.*, 2018, PAPADAS *et al.*, 2020). Contudo, a relação de VCAN e caráter biológico das neoplasias ainda é controverso, alguns autores defendem que sua alta expressão está correlacionada a progressão tumoral e desenvolvimento de metástase, enquanto outros (em menor número) apontam sua relação com prognósticos mais favoráveis (FANHCHAKSAI *et al.*, 2016; SERRA *et al.*, 2005) demonstrando funções complexas e conflitantes deste proteólito.

A relação entre VCAN e metástase foi demonstrada no estudo *in vitro* com células de carcinoma epitelial de ovário. Nestes ensaios foi investigado o papel do proteoglicano na adesão de células de carcinoma a monocamadas de células mesoteliais peritoneais *in vitro*, bem como na formação de tumores peritoneais usando um modelo *in vivo* de xenoenxerto em camundongos. Os dados demonstraram que a redução de VCAN diminuiu a adesão de células

carcinomatosas às células peritoneais. Além disso, as células carcinomatosas também exibiram capacidade significativamente diminuída de gerar tumores quando injetados na cavidade intraperitoneal de camundongo nude atímico (DESJARDINS *et al.*, 2014).

No câncer de cólon humano, estudos também indicaram que o aumento VCAN promoveu a progressão da doença (THEOCHARIS, 2002). Em contrapartida, outra pesquisa demonstrou que os níveis dessa molécula estavam relacionados com melhor prognóstico nos estádios II e III pacientes com câncer de cólon (DE WIT *et al.*, 2013).

No contexto do câncer de mama na mulher, pesquisadores apontam a relação entre acúmulo de VCAN e prognóstico desfavorável (SUWIWAT *et al.*, 2004; YEE *et al.*, 2007) e sugerem seu papel na oncogênese (DU *et al.*, 2011). Ricciardelli e colaboradores em 2002, demonstraram uma correlação entre o nível de VCAN depositado no estroma peritumoral por fibroblastos mamários e recidiva em mulheres com câncer de mama linfonodo-negativo. Estes dados indicaram que a secreção de VCAN parece ser regulada por células neoplásicas mamárias e que o remodelamento neoplásico da matriz extracelular através do seu acúmulo pode corroborar para a invasão e consequente metástase.

Na espécie canina, a participação de VCAN no câncer é ainda pouco estudada. Resultados encontrados por Mukaratirwa e colaboradores (2004) sugerem que os níveis de expressão alterados dessa molécula em tumores do cólon canino, assim como já relatado em humanos, estão relacionados a malignidade e a progressão do tumor. O sulfato de condroitina (do qual VCAN é composto) são os GAGs mais importantes na matriz extracelular de tumores mamários caninos (HINRICHS *et al.*, 1999).

Damasceno e colaboradores (2012), avaliaram 49 casos de CTM em mama de cadelas e revelaram que a expressão deste proteoglicano difere significativamente entre áreas com invasão de células neoplásicas e áreas *in situ*, sugerindo um papel importante de VCAN na progressão tumoral. Posteriormente, esse mesmo grupo avaliou a relação entre expressão de VCAN e receptores de superfície celular HER-1, -2, e -3, bem como com CD44 em tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas mamários caninos. Os achados demonstraram que os receptores HER-2, -3, CD44, bem como VCAN, eram mais expressos em áreas de invasão tumoral de carcinossarcomas quando comparados aos outros tipos histológicos, sugerindo a relação destas moléculas com agressividade tumoral (DAMASCENO *et al.*, 2016).

2.2.2.1 PROTEÓLISE DE VERSICAN

Sabe-se que a degradação da MEC tem uma grande relação causal ou influencia em diversas patologias, incluindo neoplasias mamárias (WALKER *et al.*, 2018). No desenvolvimento tumoral, este processo é crucial para a proliferação de tumores malignos, invasão, metástase e angiogênese. Essa destruição e remodelamento da MEC é um evento complexo e que conta com a participação de diversas enzimas, dentre as quais as metaloproteinases de matriz (MMP) (PICKUP *et al.*, 2014; COX e ERLER *et al.*, 2011; JOHNSEN *et al.*, 1998; NAJAFI; FARHOOD; MORTEZAEE *et al.*, 2019).

O VCAN e outros proteoglicanos hialectanos, componentes fundamentais da matriz, são diretamente regulados por ADAMTS (um domínio do tipo desintegrina e metaloproteinase com motivo trombospondina). Em situações fisiológicas, existe um equilíbrio entre as enzimas ADAMTS e os proteoglicanos, porém alguns estudos trazem fortes indícios de que, no microambiente tumoral, o desbalanço entre eles pode auxiliar a progressão tumoral ou estimular mecanismos antitumorais de maneira contexto-dependente (BINDER *et al.*, 2017; NANDADASA *et al.*, 2014).

As enzimas ADAMTS pertencem à superfamília das metzincinas que, por sua vez, representam um grande grupo de metaloproteinases dependentes de zinco. A família ADAMTS é composta por 19 membros e todos eles são formados por uma região N-terminal de protease contendo um pró-domínio, um domínio de metaloproteinase e outro semelhante a desintegrina. A diferença entre cada membro se dá por alterações na região ancilar C-terminal e são classificados conforme a ordem na qual foram descritas (APTE, 2009; STANTON *et al.*, 2011; STUPKA *et al.*, 2013).

Estas enzimas podem desempenhar diferentes atividades. ADAMTS -1, -4, -5, -8, -9, -15 e -20, por exemplo, possuem predominantemente atividade de proteoglicanase, sendo VCAN e ACAN seus principais substratos em variados tipos tumorais (pancreático, hepatocelular, cerebral, melanoma, próstata e mamário), assim como na remodelação da MEC, proliferação e morfogênese em tecido embrionário (ABSI *et al.*, 2018; BINDER *et al.*, 2017; CROSS *et al.*, 2005). Contudo, até o momento os dados relacionados ao câncer de mama em mulheres e ao câncer de mama canino são inexistentes.

A proteólise da isoforma V1 de VCAN pelas enzimas ADAMTS, na região entre Glu⁴⁴¹ e Ala⁴⁴², culmina na formação de uma molécula bioativa (Figura 2) capaz de interagir e regular diversos componentes do microambiente tumoral, incluindo linfócitos T. Tal molécula

contém o domínio N-terminal G1 e foi denominada versikina (VKINA) (NANDADASA, FOULCER E APTE, 2014).

VKINA mostrou-se um bioativo (pro-apoptótico) importante durante a regressão do tecido interdigital em embrião de rato (MCCULLOCH *et al.*, 2009). Recentemente, Hope e colaboradores (2016) demonstraram que a atuação deste proteólito vai além da fase embrionária, sendo considerada um padrão molecular associado a dano endógeno (DAMP). Nesse estudo, macrófagos associados a mieloma primário foram expostos à a molécula recombinante, o que provocou aumento da expressão nos níveis de citocinas inflamatórias (IL-6 e IL-1 β). Na sequência, o mesmo grupo demonstrou também a participação de VKINA na diferenciação de macrófagos M1, por meio do aumento dos níveis de IL-12p40. No entanto, ao estimular os macrófagos com o proteólito e complexos imunes ao mesmo tempo, notou-se predominância de macrófagos M2B imunorregulatório (GUPTA *et al.*, 2017; HOPE *et al.*, 2014, 2016b).

No câncer colorretal humano (CCR), a proteólise de VCAN foi relatada como um regulador chave da infiltração de células T CD8 +, sendo inclusive considerada uma matriquina nesse contexto (HOPE *et al.*, 2017). CCR com proteólise VCAN ativa e menores níveis da forma íntegra de VCAN foram associados a infiltração de células T CD8 + dez vezes mais robusta (EMMERICH *et al.*, 2018). Sendo assim, a formação de versikina pode consistir em um provável modulador do contexto inflamatório em CCR (ASIMAKOPOULOS *et al.*, 2017; DEMING *et al.*, 2017; EMMERICH *et al.*, 2018; HOPE *et al.*, 2017).

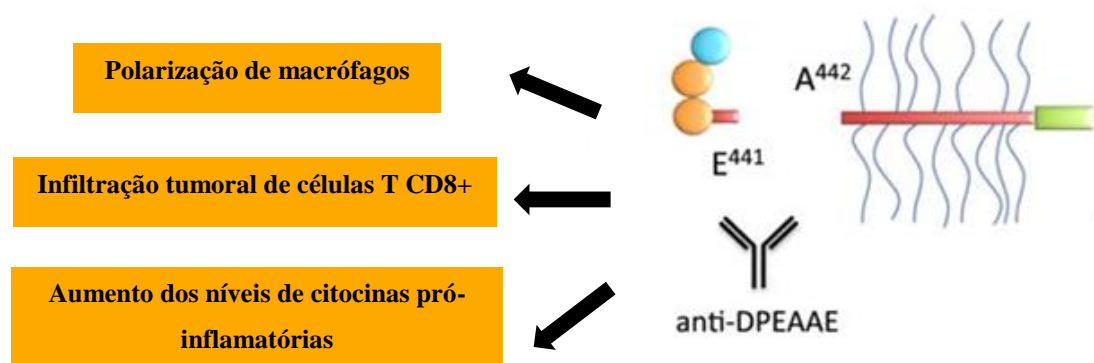


Figura 2. Efeitos da proteólise de Versican descritos na literatura. A clivagem de VCAN na região entre os aminoácidos Glu⁴⁴¹ e Ala⁴⁴² geram o proteólito bioativo VKINA. A literatura sugere que VKINA é capaz de induzir a proliferação de macrófagos, estimular a infiltração de células T CD8+ e o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Fonte: Modificando de Nandadasa; Foulcer; Apte, 2014

2.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER DE MAMA

A inflamação é um importante componente do microambiente tumoral e é considerado o sétimo "Hallmark" do câncer. Ao longo do tempo, uma tênue relação entre inflamação e progressão tumoral têm sido demonstrada. Dessa forma, acredita-se que estudos concentrados em possíveis padrões imunofenotípicos associados aos aspectos clínicos e biológicos de distintos tipos tumorais podem auxiliar na descoberta de novos biomarcadores prognósticos, alvos terapêuticos e estratégias preventivas (COLOTTA *et al.*, 2009).

O microambiente tumoral é dinamicamente moldado por células inflamatórias, citocinas e proteoglicanos, e exerce crítico papel no processo neoplásico por meio da interação com as células tumorais promovendo proliferação, sobrevivência, migração e até mesmo formação de sítios metastáticos precoces (DENARDO e COUSSENS., 2007).

O infiltrado inflamatório tumoral pode consistir em uma população diversificada de leucócitos, por vezes atraídos por citocinas sintetizadas pelas próprias células neoplásicas e não somente por uma reação inflamatória em combate a elas. Macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos geram uma rede de mediadores citotóxicos, proteases, mediadores de morte celular (como TNF- α e PDL-1), interleucinas e interferons (IFNs) que, quando orquestrados pelas células cancerosas, culminam em um microambiente favorável à lesão tumoral (DENARDO e COUSSENS, 2007; CONKLIN e KEELY, 2012; PICKUP *et al.*, 2014; DUSHYANTHEN *et al.*, 2015; LOI *et al.*, 2016).

A infiltração de leucócitos, pode eliminar ou promover o desenvolvimento de cânceres de mama, dependendo do imunofenótipo e do contexto no qual as células inflamatórias estão inseridas (DENARDO e COUSSENS, 2007; COUSSENS E POLLARD, 2011). Kristensen e colaboradores (2012), sugeriram que o perfil de resposta imunológica e a assinatura inflamatória de mulheres com câncer de mama podem fornecer informações sobre o prognóstico e tratamento da paciente.

Dentre as células que podem ser encontradas no infiltrado inflamatório tumoral estão os neutrófilos. Há pouco tempo atrás, os neutrófilos eram considerados meros expectadores no microambiente tumoral, porém, mais recentemente, novas evidências indicam que os tumores modulam os neutrófilos para criar diversos estados de polarização fenotípica e funcional capazes de alterar o comportamento do tumor (COFFEELT; WELLENSTEIN; DE VISSER.,2016). Em um modelo de novo de adenocarcinoma endometrial [progesterone

receptor (Pgr)-Cre;PtenF/F mice], o bloqueio do recrutamento de neutrófilos por deleção genética de G-CSFR ou CXCR2 aumentaram a carga tumoral uterina. Ainda nesse estudo, foi possível perceber que os neutrófilos se opõem à carcinogênese epitelial uterina por meio de desbridamento de células tumorais em hipóxia (BLASDELL et al., 2015). Alguns estudos relatam que os neutrófilos podem ser importantes nas etapas iniciais dos eventos de metástase em modelos experimentais de metástase pulmonar ou hepática. Neste modelo, quando as linhagens de células cancerígenas são injetadas na circulação ou baço, a depleção sistêmica de neutrófilos (via anticorpos anti-Gr1) reduz a formação de metástases (TAZAWA et al., 2003; SPICER et al., 2012). Além disso, os neutrófilos podem usar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para sequestrar as células cancerígenas circulantes a fim de promover a adesão destas células em órgãos distantes. *In vitro*, as NETs também estimulam a migração e invasão de células neoplásicas (COOLS-LARTIGUE et al., 2013).

As células NK (*Natural killer*) podem reconhecer células tumorais por mecanismos únicos, sendo capazes de reconhecer e matar rapidamente as células tumorais. Além disso, estas células possuem reatividade limitada contra tecidos saudáveis, por isso são atualmente conhecidas como promissoras "drogas vivas" anticâncer. O grau de infiltração de células NK nos tumores é considerado fator prognóstico em alguns estudos e uma função reduzida das células NK foi associada a pior desfecho (ALBERTSSON et al., 2003; MANDAL et al., 2016). Em pacientes com câncer colorretal, a deleção de IL-15 (citocina associada a proliferação e ativação de células NK) e a redução na sua expressão foram associadas a um maior risco de recidiva (SEMERARO et al., 2015).

Macrófagos associados ao tumor (TAM) medeiam variados aspectos da biologia tumoral, a exemplo da modulação de respostas adaptativas, remodelamento da MEC, angiogênese, proliferação celular, evasão de células neoplásicas, influenciando também na criação do nicho metastático e na resposta a quimioterápicos (COLOTTA et al., 2009). Ainda que bastante explorados, os mecanismos envolvidos na participação destas células na progressão tumoral ainda precisam ser melhor compreendidos para busca de novas estratégias de prevenção e tratamento.

Muitos estudos clínicos têm associado o aumento de infiltrado histiocítico ao mau prognóstico de indivíduos com diferentes tipos tumorais, incluindo carcinomas mamários. Nestes tumores, macrófagos constituem a principal população de células inflamatórias, tendo funções críticas na progressão dessas neoplasias (JEFFREY et al., 2004; TANG, 2013; OSTUNI et al., 2015; SOUSA et al., 2015). Em 2004, um grupo utilizou camundongos transgênicos capazes de gerar macrófagos tumorais fluorescentes para mostrar que sua

interação com células tumorais facilita a migração dessas células em carcinoma mamário. Esse estudo evidenciou pela primeira vez um gancho parácrino e uma interação sinérgica entre macrófagos e células tumorais durante a migração celular *in vivo*, indicando contribuição dos macrófagos para a metástase. Nesse processo de progressão, o fator estimulante de colônia 1 (CSF-1), CCL2 (descrita como um atrativo para macrófagos derivados de tumores), enzimas atuantes na remodelação tecidual, ciclooxigenase 2 e NF- κ B participam ativamente da carcinogênese e influenciam as células neoplásicas da glândula mamária a adquirirem um fenótipo metastático (JEFFREY *et al.*, 2004).

A polarização de macrófagos é um evento muito estudado na dinâmica do câncer. Na literatura, são descritas duas subpopulações dessas células: macrófagos classicamente ativados, denominados M1; e alternativamente ativados (M2). Porém, um novo fenótipo de macrófago vem sendo caracterizado e foi denominado M3 ou macrófagos chave (MALYSHEV e MALYSHEV, 2015). Macrófagos M1 são dotados de funções pró-inflamatórias e tumorocidas, enquanto as células M2 são especializadas em inibir inflamação e reparar danos teciduais. A polarização para um ou outro subtipo depende de variados fatores, porém já se sabe que a exposição a estímulos pró-inflamatórios, como IFN γ , TNF- α e GM-CSF, padrões moleculares associados a patógenos e sinais endógenos de perigo induzem a geração de macrófagos M1 (MANTOVANI *et al.*, 2013). Os macrófagos alternativamente ativados, por sua vez, sofrem estímulo por citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , glicocorticoides e componentes da matriz extracelular que podem ser produzidos por células tumorais (OSTUNI *et al.*, 2015). Em 2015, um estudo de coorte demonstrou que, células neoplásicas de câncer de mama humano são capazes de induzir macrófagos ao estado de ativação M2 e que TAMs CD163+ estão associados com outros fatores prognósticos comuns como rápida proliferação, pouca diferenciação e negatividade para receptor de estrogênio. Como consequência, TAMs CD163+ estão relacionados a diminuição da sobrevida livre de recorrência neste tipo de câncer (SOUSA *et al.*, 2015).

No que diz respeito às neoplasias mamárias caninas, poucas pesquisas abordaram o papel dos TAMs. Porém já se sabe que tumores malignos exibiram mais macrófagos associados ao tumor quando comparados aos benignos (MONTEIRO *et al.*, 2018). Além disso, os TAMs apresentaram correlação com ulceração da epiderme, tipo histológico, grau nuclear e diferenciação tubular e diminuição da sobrevida, sendo assim considerado um interessante marcador prognóstico também nessa espécie (RAPOSO *et al.*, 2014). Aparentemente, as células carcinomatosas também induzem o fenótipo dos macrófagos, os quais retroalimentam um ciclo de ativação mútua através da liberação de mediadores como

CSF-1 e o CCL2, semelhante ao que ocorre na mulher (BEIRÃO *et al.*, 2015). Vieira- Filho e colaboradores (2018) perceberam que cadelas com diagnóstico histopatológico de CTM apresentavam maiores proporções de macrófagos no infiltrado inflamatório (≥ 400 /tumor) e também tiveram maior taxa de sobrevida em comparação àquelas com um infiltrado de macrófagos mais discreto. Além disso, a pesquisa revelou que a maior expressão de SOCS3 nos macrófagos ativados pode ser considerada indicativa de uma resposta imune antitumoral, melhores parâmetros clínicos e maior taxa de sobrevida

O papel da resposta linfocítica associada ao tumor ainda é considerada controversa, porém alguns trabalhos relatam que a presença de linfócitos no microambiente tumoral pode ser benéfica em várias neoplasias (DENARDO e COUSSENS, 2007; PAGÈS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2003).

No câncer de mama, o infiltrado linfocítico já é considerado um marcador prognóstico de melhor resposta a quimioterapias neoadjuvantes e melhor sobrevida em mulheres, principalmente no tumor mamário triplo negativo e no HER-2 + (DENKERT *et al.*, 2010, 2018; DUSHYANTHEN *et al.*, 2015). Nestes tumores humanos, o número total de linfócitos T é diretamente proporcional a um aumento da sobrevida dessas pacientes, sendo considerado um fator prognóstico independente (DUSHYANTHEN *et al.*, 2015; MAHMOUD *et al.*, 2011).

Tais resultados corroboram para a hipótese que o sistema imune contribui consistentemente para a eficácia da quimioterapia (DENKERT *et al.*, 2018), incentivando assim o estudo e a implementação de novas terapias que envolvam estratégias de imunomodulação, principalmente no que diz respeito a atuação de linfócitos T (RUSSELL e LEY, 2002; MARTÍNEZ-LOSTAO *et al.*, 2015).

Apesar do número crescente de trabalhos focados na atividade de células T frente às células tumorais, o papel desses linfócitos no câncer mamário em mulheres e cadelas ainda permanece obscuro. Isso se torna ainda mais evidente na espécie canina sobre a qual pouco se sabe a respeito da influência de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) (CARVALHO *et al.*, 2014).

Analisando amostras de carcinoma em tumor misto e outros carcinomas mamários caninos, Estrela-Lima e colaboradores (2010) demonstraram que TILs foram as células mais abundantes nos referidos tipos histológicos. O estudo também revelou que a frequência de linfócito T foi maior em animais com CTM sem metástase, ao passo que a porcentagem de linfócitos B e a presença de células T CD8+ foram maiores em animais com metástase (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010). Posteriormente, Estrela-Lima *et al.* (2012) relataram que

cadelas com carcinoma em tumor misto exibiram maiores porcentagens de células LT CD8+ circulantes e taxas normais ou baixas de LT CD4+ nos casos sem metástases para linfonodo, conferindo menor razão CD4+/ CD8+. Neste trabalho, os autores sugeriram que razão CD4+/CD8+ em sangue periférico teria um importante papel como fator prognóstico independente em carcinoma mamário nessa espécie.

A relação entre TILs e fatores genéticos também já foi explorada previamente na espécie canina. Kim e colaboradores (2010) observaram uma associação entre TILs, citocinas (IL-1 E IL-6) e mutação no gene BRCA 1, sugerindo que essas variáveis podem estar ligadas a piores prognósticos, consequentemente à presença de metástase.

Deste modo, acreditamos que a proteólise de VCAN tem relação com a agressividade tumoral e potencial biomarcador inflamatório no câncer de mama canino. Sendo assim, análise da proteólise de VCAN no microambiente tumoral, bem como as características do infiltrado tumoral na presença de VKINA, a relação desta matriquina com invasividade e fatores clinicopatológicos poderão contribuir no entendimento do comportamento biológico dos carcinomas mamários caninos, desenvolvimento de novos biomarcadores tumorais e candidatos a terapias adjuvantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre a proteólise de versican, parâmetros clínico-patológicos e inflamatórios em CTM e CSS mamários caninos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de versican, versikina e enzimas proteolíticas da família ADAMTS em microambiente tumoral de carcinoma em tumor misto e carcinossarcoma mamário canino;
- Correlacionar o perfil de expressão de Versican, versikina e enzimas ADAMTS com a gravidade e prognóstico da doença;
- Realizar análise qualitativa e quantitativa das fibras de colágeno adjacentes à áreas de invasão carcinomatosa e lesões *in situ* e correlacionar com expressão de versican e versikina;
- Avaliar a relação entre proteólise de VCAN e parâmetros inflamatórios séricos e teciduais;

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

No presente estudo, foram acompanhadas 86 cadelas diagnosticadas com neoplasia mamária, com tumores acima de 3 cm de diâmetro, e submetidas a mastectomia radical unilateral pelo Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto (HOSPMEV/UFBA). Dessas pacientes caninas, foram colhidos fragmentos de tumores mamários primários, bem como sangue periférico para realização de hemograma e leucograma.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Gonçalo Moniz, cujo número do protocolo é 07/2018.

4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

No centro cirúrgico, logo após a exérese da cadeia mamária, os nódulos foram medidos e clivados, em seguida foram colhidos pelo menos 4 fragmentos, medindo 1 x 1 x 0,5 cm cada, do maior nódulo (se múltiplos nódulos), evitando-se áreas de necrose. Os fragmentos de tumor foram acondicionados em formol neutro tamponado 10% para avaliação histopatológica. Em seguida, a cadeia mamária foi imediatamente encaminhada ao Laboratório de Patologia Veterinária (HOSPMEV/UFBA). No momento da cirurgia, antes da indução anestésica, colheu-se também 2mL de sangue periférico. O sangue foi colhido em seringas descartáveis estéreis de 3 mL, através de venopunção da jugular, em seguida transferido para tubos estéreis contendo EDTA e mantido a temperatura de 4°C para realização de hemograma.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Foi realizada avaliação clínica geral seguida do exame específico da glândula mamária que consistiu na palpação da cadeia mamária em toda sua extensão, assim como dos linfonodos inguinais e axilares. Todas as alterações macroscópicas foram caracterizadas e descritas (tamanho, mobilidade, ulcerações, aderência ou outra qualquer outra alteração digna de nota).

4.4 EXAMES COMPLEMENTARES

As cadelas foram encaminhadas para realização de radiografia simples do tórax em três incidências, látero-lateral direita (LLD), látero-lateral esquerda (LLE) e ventro-dorsal (VD), além de ultrassonografia abdominal, ambas para a pesquisa de metástases à distância (pulmonar ou em órgãos abdominais). Além disso, cadelas com idade superior a 7 anos ou com histórico prévio de cardiopatia foram submetidas a avaliação cardiológica antes da cirurgia. Após a cirurgia, as pacientes continuaram a ser acompanhadas por até dois anos quanto à recidiva e desenvolvimento de metástase à distância.

4.5 PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

4.5.1 Estadiamento clínico

O estadiamento clínico foi realizado de acordo com o sistema TNM estabelecido pelo *World Health Organization* (WHO) para neoplasias mamárias caninas (modificado de OWEN, 1980). O sistema se baseia no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástase à distância (M), de acordo com o sistema TNM (modificado de Owen, 1980) (Anexo 2). Os tumores foram mensurados em pelo menos duas dimensões. Quando as cadelas apresentaram mais de um nódulo, cada um foi medido separadamente, sendo considerada para a realização do estadiamento clínico a maior medida do tumor invasivo. A aderência do nódulo (não aderido, aderido à pele e aderido ao músculo) foi avaliada durante a primeira consulta oncológica do animal e também na macroscopia do espécime mamário. A avaliação macroscópica dos linfonodos inguinais e axilares foi realizada pela palpação dos mesmos e a presença ou não de envolvimento neoplásico foi determinada pelo exame histopatológico após a exérese cirúrgica da mama envolvida, realizada no Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV/UFBA.

4.5.2 Análise Histopatológica

Para análise histopatológica, secções histológicas de 4µm foram obtidas dos fragmentos mamários processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas por Hematoxilina-Eosina. A identificação do tipo histológico seguiu as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* (Cassali *et al.*, 2014), sendo realizada por um patologista veterinário especialista em oncologia mamária. Para o presente estudo, foram selecionados apenas os casos diagnosticados com carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas.

4.5.3 Graduação histológica

Os tumores foram graduados pelo Sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS, 1998) cujos critérios de análise incluem formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica resultando em um sistema de escores. O escore 1 foi atribuído às secções histológicas que apresentarem mais de 75% da área carcinomatosa formada por túbulos, escore 2 entre 10% - 75% e escore 3 entre 0 - 10%. Para análise de pleomorfismo nuclear, escore 1 foi atribuído para núcleos pequenos e regulares e cromatina uniforme, o escore 2 foi relacionado aos tumores que exibiam anisocariose moderada, o escore 3 foi atribuído a presença de células com acentuada anisocariose e pleomorfismo, apresentando núcleos bizarros e vesiculosos e com múltiplos nucléolos. A contagem mitótica foi realizada por dois observadores de forma individualizada, sendo o resultado final obtido a partir da média dos valores. As figuras mitóticas foram contadas em 10 CGA (Campo de Maior Aumento) selecionados principalmente na periferia do tumor onde há atividade proliferativa mais acentuada (ELSTON e ELLIS, 1991; ELSTON e ELLIS, 1998). Os escores foram definidos conforme o número de figuras mitóticas contadas: 1 (0-8 mitoses); escore 2 (9- 16 mitoses) e escore 3 (acima de 17 mitoses). A fim de se obter a graduação histológica final, somou-se o escore de cada parâmetro gerando um valor que vai de 3 a 9:

3 – 5 pontos: grau I – baixo grau;

6 – 7 pontos: grau II – grau intermediário;

8 – 9 pontos: grau III – alto grau.

4.5.4 Índice Prognóstico de Nottingham

O Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) foi desenvolvido para predição da sobrevida de pacientes humanos com neoplasia mamária primária (ELSTON e ELLIS, 1998). De maneira semelhante, o IPN foi calculado em todas as cadelas deste estudo. O índice foi calculado a partir do tamanho do nódulo (cm), escore do linfonodo e graduação definido pelo sistema de Nottingham. Desta forma:

$$\text{IPN} = 0,2 \times \text{tamanho (cm)} + \text{escore de linfonodos (1-3 de acordo com o estadio)} + \text{grau (I - III)}.$$

Os valores de IPN permitiram distribuir os casos em três grupos: < 3,4 (bom prognóstico); 3,41 – 5,4 (prognóstico moderado) e > 5,41 (prognóstico ruim) (ELSTON e ELLIS, 1998).

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Nesta técnica, utilizou-se anticorpos primários (Tabela1) para detecção de: versican (12C5, DSHB), neo-epítipo de versican DPEAAE (policlonal, ThermoFisher Scientific), ADAMTS1 (3C8F4, Santa Cruz), ADAMTS5 (Abcam), ADAMTS8 (policlonal, Invitrogen), ADAMTS9 (policlonal, Invitrogen), ADAMTS15 (561819, Invitrogen,) e CD68 (KP1, Invitrogen), conforme as diluições definidas na tabela 1. Estas enzimas ADAMTS foram selecionadas por serem descritas na literatura como capazes de degradar VCAN (BINDER *et al.*, 2019) Para revelação polimérica foi utilizado o kit Novolink™ Max Polymer Detection System. Ao final, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

A expressão de versican e neo-epítipo DPEAAE (versikina) foi avaliada no citoplasma de células epiteliais e no estroma das áreas adjacentes a proliferação epitelial maligna *in situ* (IS) ou invasora (IN). A análise se deu de forma semi-quantitativa, incluindo a porcentagem da área positivamente marcada (0-100%) e a intensidade de marcação para o proteoglicano (0-3). De acordo com a escala, (0) é considerado negativo, (1) positivo fraco, (2) positivo moderado e (3) positivo forte. No estroma, o grau de expressão de versican e versikina foi então dado pela multiplicação da porcentagem (0-100%) pela intensidade (0- negativa, 1- fraca, 2- moderada e 3- intensa) (adaptado de Damasceno *et al.*, 2012). Para a análise da presença de VCAN e VKINA no citoplasma de células epiteliais malignas, considerou-se a intensidade de marcação (0- negativa, 1- fraca, 2- moderada e 3- intensa). Assim como para VCAN e VKIN, células que apresentaram marcação positiva para as

enzimas ADAMTS foram classificadas conforme o tipo celular (epitelial), área de análise (*in situ* ou invasão) e conforme o escore de expressão obtido a partir da multiplicação da intensidade de marcação (0-3) pela extensão da área marcada em porcentagem (0-100%) (adaptado de Freitas *et al.*, 2013).

A análise da expressão de CD68 se deu a partir da média da contagem de células positivamente marcadas em 5 campos representativos da resposta inflamatória (“hotspots”) associados ou não às áreas de invasão de células neoplásicas (em toda secção histológica) (REIS *et al.*, 2019).

Tabela 1 Anticorpos utilizados para Análise Imuno-histoquímica

ANTICORPO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO
Versican	12C5	DSHB	1:50
DPEAAE	Policlonal	ThermoFisher Scientific	1:500
ADAMTS1	3C8F4	Santa Cruz	1:80
ADAMTS5	Ab41037	Abcam	1:100
ADAMTS8	31G7	Invitrogen	1:100
ADAMTS9	Policlonal	Invitrogen	1:1000
ADAMTS15	561819	Invitrogen	1:500
CD68	KP1	Invitrogen	1:100

4.7 COLORAÇÕES ESPECIAIS E HISTOMORFOMETRIA

Para análise e caracterização das fibras de colágeno, secções histológicas foram submetidas às colorações especiais. O Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi utilizado para avaliação da integridade das membranas basais (BUIJS, *et al.*, 2004), auxiliando assim a identificação de áreas *in situ*. O Tricrômico de Masson foi utilizado para mensuração do colágeno total presente nas regiões adjacentes às áreas de invasão e às áreas carcinomatosas *in situ* (MAO *et al.*, 2020). A coloração Picrosirius red foi empregada para caracterização do colágeno em tipo I ou tipo III sob luz polarizada (LATTOUF *et al.*, 2014; RITTIÉ, 2017). As análises de Tricrômico de Masson e Picrosirius red foram realizadas em fotomicrografias capturadas em 10 campos histológicos, na objetiva de 40x, utilizando a câmera digital do

microscópio LEICA LMD 6500, software de captura LAS[®] versão 4.5. Os pixels azuis (Tricrômico de Masson), verde ou vermelho (Picrosirius red) foram quantificados a partir de um método semi-automático padronizado em nosso laboratório (LAPEX – Laboratório de Patologia Experimental) utilizando o software ImageJ[®], versão Fiji (ferramenta *Versatile*), o qual permitiu a determinação da área (μm) ocupada pelas fibras de colágeno, bem como, intensidade de coloração das fibras.

4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TUMORAL

A análise morfológica e morfométrica do infiltrado inflamatório foi realizada por meio de fotomicrografias de oito campos histológicos ("Hot Spots") selecionados na objetiva de 40x, utilizando a câmera digital do microscópio LEICA LMD 6500, software LAS[®], versão 4.5. Neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos foram identificados com base em suas características morfológicas e quantificadas manualmente utilizando o software ImageJ[®], versão Fiji, para análise das imagens e contagem das células.

4.9 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Também foram colhidas amostras de sangue periférico obtidas antes do procedimento cirúrgico para análise dos parâmetros hematológicos. Os dados do leucograma e contagem diferencial foram obtidos dos laudos emitidos pelo Laboratório de Análises Clínicas do HOSPVEV/UFBA.

4.10 ANÁLISE DE SOBREVIDA E ACOMPANHAMENTO

O acompanhamento das cadelas foi realizado entre janeiro de 2018 à julho de 2020, por meio de informações obtidas nos prontuários das pacientes caninas, contato direto com os tutores ou com o corpo clínico do Núcleo de Oncologia Mamária do HOSPMEV/UFBA. A sobrevida global foi dada pelo tempo decorrido entre a data da cirurgia e data de óbito da paciente que morreu pela doença. As pacientes foram consideradas censuradas quando foi perdido o contato com o tutor do animal.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Grap Pad Instat v. 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi avaliada utilizando os testes Shapiro-Wilk e D'Agostino & Pearson. Os resultados quantitativos obtidos que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, seguido de teste de médias. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Mann Whitney ou teste T. As correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson. Acurácia da proteólise de VCAN como marcador de grau histológico, IPN e metástase foi mensurada pela área sob a curva ROC (AUC). O AUC com significância acima de 0,5. A análise de Kaplan Meyer (teste de log-rank) foi usada para avaliar a sobrevida global. Valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,005$.

5. RESULTADOS

5.1 ANIMAIS E ESPÉCIMES MAMÁRIAS

Dentre as 86 cadelas acompanhadas desde o princípio do estudo e submetidas a mastectomia, após o exame anatomopatológico, 47 foram diagnosticadas com carcinoma em tumor misto ou carcinossarcoma e elegíveis para o estudo. As cadelas selecionadas possuíam entre 5 e 20 anos, com média de 12 anos. Animais da raça *poodle* e SRD (sem raça definida) foram os mais frequentes, equivalendo a 33,7% e 31,5 % do número total respectivamente, enquanto 34,8 % das pacientes pertenciam a outras raças (Pinscher, Pitbull, Labrador, Yorkshire e Daschund, Pastor Alemão, Dalmata e Beagle).

5.2 PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS GERAIS

Dentre as 47 cadelas elegíveis, 30 apresentaram diagnóstico histopatológico de carcinoma em tumor misto e 17 apresentaram carcinossarcoma.

No total, quatro animais apresentaram metástase em linfonodo inguinal, três deles eram de pacientes com CTM e um de CSS. Apenas duas cadelas foram diagnosticadas com metástase à distância confirmadas por meio de exames de imagem (presença de nódulos pulmonares), esses animais possuíam o diagnóstico de CSS.

A análise do grau histológico revelou que a maioria dos CTMs apresentaram grau I, enquanto nos carcinossarcomas predominaram os graus II e III ($p=0.0331$). O Índice de prognóstico de Nottingham predominante foi $< 3,4$ (bom prognóstico) em CTMs e $3.41 - 5.4$ (prognóstico moderado) nos CSSs. Os dados completos estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros clínico-patológicos gerais das cadelas diagnosticadas com carcinoma em tumor (CTM) e carcinossarcoma (CSS)

<i>Parâmetros</i>	<i>N</i>	<i>CTM</i>	<i>CSS</i>	<i>P Valor</i>
	47			
<i>Metástase em linfonodo</i>	4	3/30 (10,00)	1/17 (5,88)	-
<i>Metástase pulmonar</i>	2	0/30 (0)	2/17 (11,76)	-
<i>Tamanho</i>				
<i>< 3 cm</i>	0	0/30 (0)	0/17(0)	
<i>3 ≤ x5 cm</i>	19	13/30 (43,33)	6/17 (35,29)	0,3752
<i>≥ 5cm</i>	28	17/30 (56,66)	11/17 (64,70)	
<i>Estadiamento clínico</i>				
<i>I</i>	0	0/30 (0)	0/17 (0)	
<i>II</i>	17	13/30 (43,33)	4 /17(23,52)	0,1441
<i>III</i>	24	14 /30 (47,82)	10/17 (58,82)	
<i>IV</i>	4	3/30 (10,00)	1/17 (5,88)	
<i>V</i>	2	0 /30 (0)	2/17 (11,76)	
<i>Grau histológico</i>				
<i>I</i>	22	17/30 (56,66)	5/17 (29,41)	
<i>II</i>	16	10/30 (33,33)	6/17 (35,29)	0,0331
<i>III</i>	9	3/30 (10,00)	6/17 (35,29)	
<i>IPN</i>				
<i><3.4</i>	28	22/30 (73,33)	6 /17 (35,29)	
<i>3.41 – 5.4</i>	18	7/30 (23,33)	11/17 (78,57)	0.368
<i>>5.4I</i>	1	1/30 (3,30)	0/17 (0)	

Teste T foi utilizado para os dados paramétricos (tamanho e IPN) e para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Mann Whitney. Os valores de p foram considerados significativos quando <0,05.

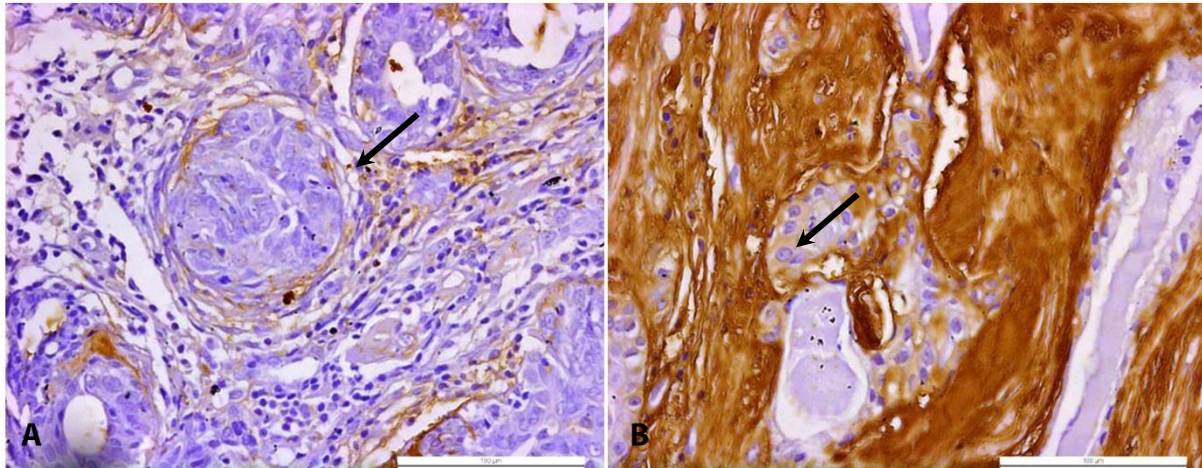
5.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA EM CTM E CSS E SUA CORRELAÇÃO COM GRAVIDADE E PROGNÓSTICO DA DOENÇA

5.3.1 Expressão Imuno-histoquímica de VCAN em CTM e CSS

Marcação positiva para VCAN pode ser observada em todas as lâminas avaliadas, porém cinco secções histológicas foram excluídas devido a presença de intensa marcação inespecífica (background) ou pela queda dos cortes durante a realização da técnica de imuno-histoquímica. O padrão de expressão predominante foi a marcação em estroma, que variou de fraco à intenso (Figura 3B). Marcação citoplasmática (Figura 3B) foi observada em apenas 7 casos (3 de CTM e 4 de CSS) (Figura 3C).

Nos CTM, VCAN foi mais expresso no estroma adjacente às áreas de invasão quando comparado com áreas *in situ* ($p < 0,0001$) (Figuras 3 A, B e D). Já nas amostras de CSS, não foi observada diferença de expressão entre áreas *in situ* ou de invasão ($p = 0,0610$). Em uma análise geral (CTM e CSS), VCAN também esteve mais presente no estroma em áreas de invasão carcinomatosa (Figura 3E). Ao comparar as áreas *in situ* ou de invasão entre os dois tipos histológicos, não houve diferenças estatísticas significativas quanto à presença de VCAN.

Considerando os fatores clinico- patológicos, ao analisar as amostras conforme seu grau histológico, foi observada maior expressão epitelial de VCAN em tumores de grau III quando comparada ao grau I ($p = 0,0403$) (Figura 3C). Também foi possível observar que todos os casos com metástase à distância apresentaram alta expressão de VCAN (Apêndice A).

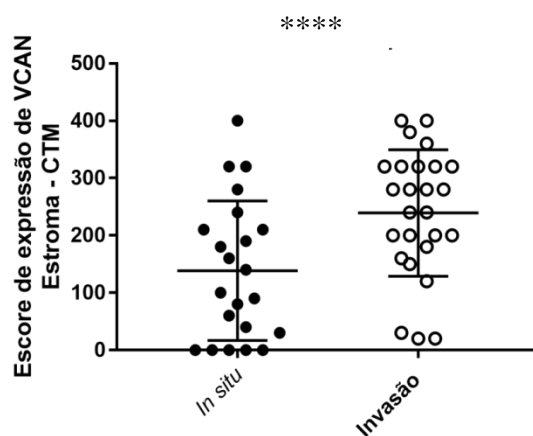


C

	Ausente	Fraco	Moderado	Intenso
GRAU I	14	0	1	0
GRAU II	13	1	1	0
GRAU III	5	3	1	0

Número de amostras

D



E

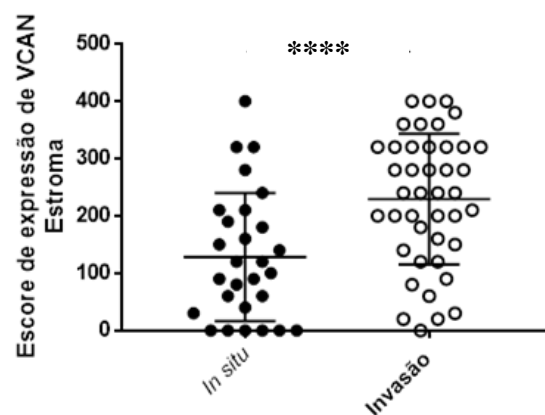


Figura 3. Expressão Imuno-histoquímica de Versican.(A) Expressão de VCAN no estroma adjacente às áreas carcinomatosas *in situ* em CTM (seta), 400x. (B) Expressão citoplasmática de VCAN em células carcinomatosas (seta) e em estroma adjacente às áreas de invasão em CTM 400x. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer. (C) Número de amostras distribuídas conforme a intensidade de expressão epitelial de VCAN e grau histológico, com

diferença estatística entre grau I e III, $p= 0,0403$, Teste Mann Whitney. **(D)** Diferença na expressão de VCAN em estroma entre áreas carcinomatosas *in situ* e de invasão em CTM ($p= <0,0001$, teste de Wilcoxon). **(E)** Diferença na expressão de VCAN em estroma entre áreas carcinomatosas *in situ* e de invasão considerando os dois tipos histológicos ($P=<0,0001$, teste de Wilcoxon). Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

5.3.2 Caracterização do Perfil de expressão de VKINA em CTM e CSS

Todos os casos analisados foram positivos para expressão de VKINA. Duas secções histológicas foram excluídas devido a presença de marcação de fundo inespecífica (background), sendo uma pertencente a um caso de CSS e outra de CTM. Três tipos de marcação foram observados nas amostras estudadas: marcação citoplasmática, membranar e no estroma (Figura 4 A, B e C). Forte marcação de VKINA também foi frequentemente encontrada no estroma de áreas com deposição de matriz mixóide (Figura 4 D). Expressão citoplasmática em células epiteliais neoplásicas esteve presente na maioria dos casos (84, 4%), com intensidade que variou de fraca a intensa (Figura 5 C).

Nos CTM, VKINA foi mais expressa no estroma adjacente às áreas de invasão (Figura 5B) quando comparado com áreas *in situ* (Figura 5A e Figura 5D, $p= 0,0048$). Quanto aos carcinossarcomas, não foi observada diferença entre áreas *in situ* ou de invasão ($p= 0,1837$). Na análise geral (CTM e CSS) não foi encontrada diferença estatística entre áreas *in situ* e de invasão neoplásicas.

Quanto ao grau histológico, VKINA esteve mais presente no estroma de tumores de grau III comparados ao de grau I (Figura 5E). Vale ressaltar que os 4 casos que apresentaram metástase em linfonodo revelaram valores altos de expressão de VKINA (acima de 160) (Apêndice B e C).

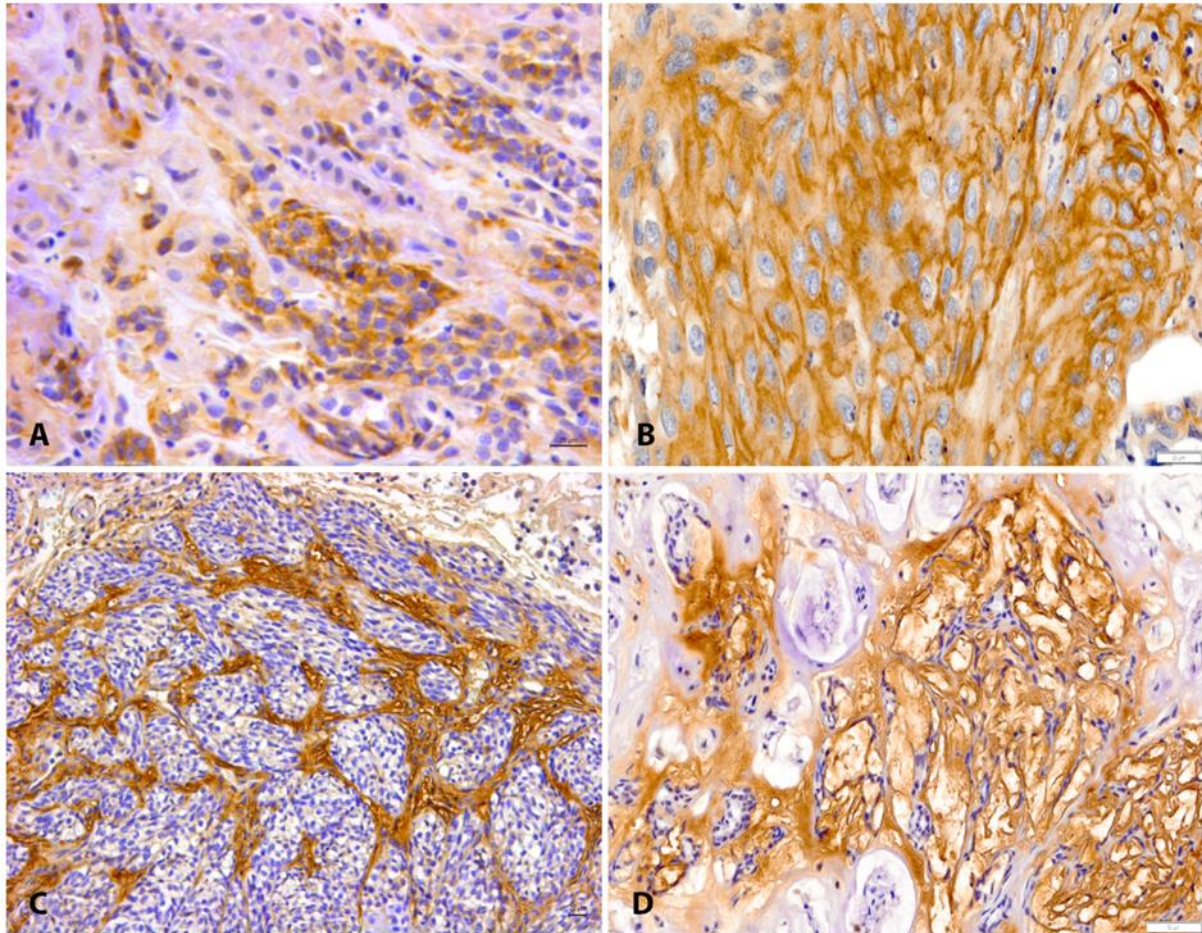


Figura 4. Imunomarcção de VKINA em tumores mamários caninos. (A) Expressão de VKINA no citoplasma de células carcinomatosas em carcinossarcomas, 400x. (B) Marcação de VKINA em membrana de células epiteliais com diferenciação escamosa em carcinoma em tumor misto, 400x. (C) Expressão de VKINA em estroma adjacente às áreas carcinomatosas de invasão em carcinossarcoma, 200X. (D) Expressão de VKINA em matriz mixóide de carcinoma em tumor misto. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

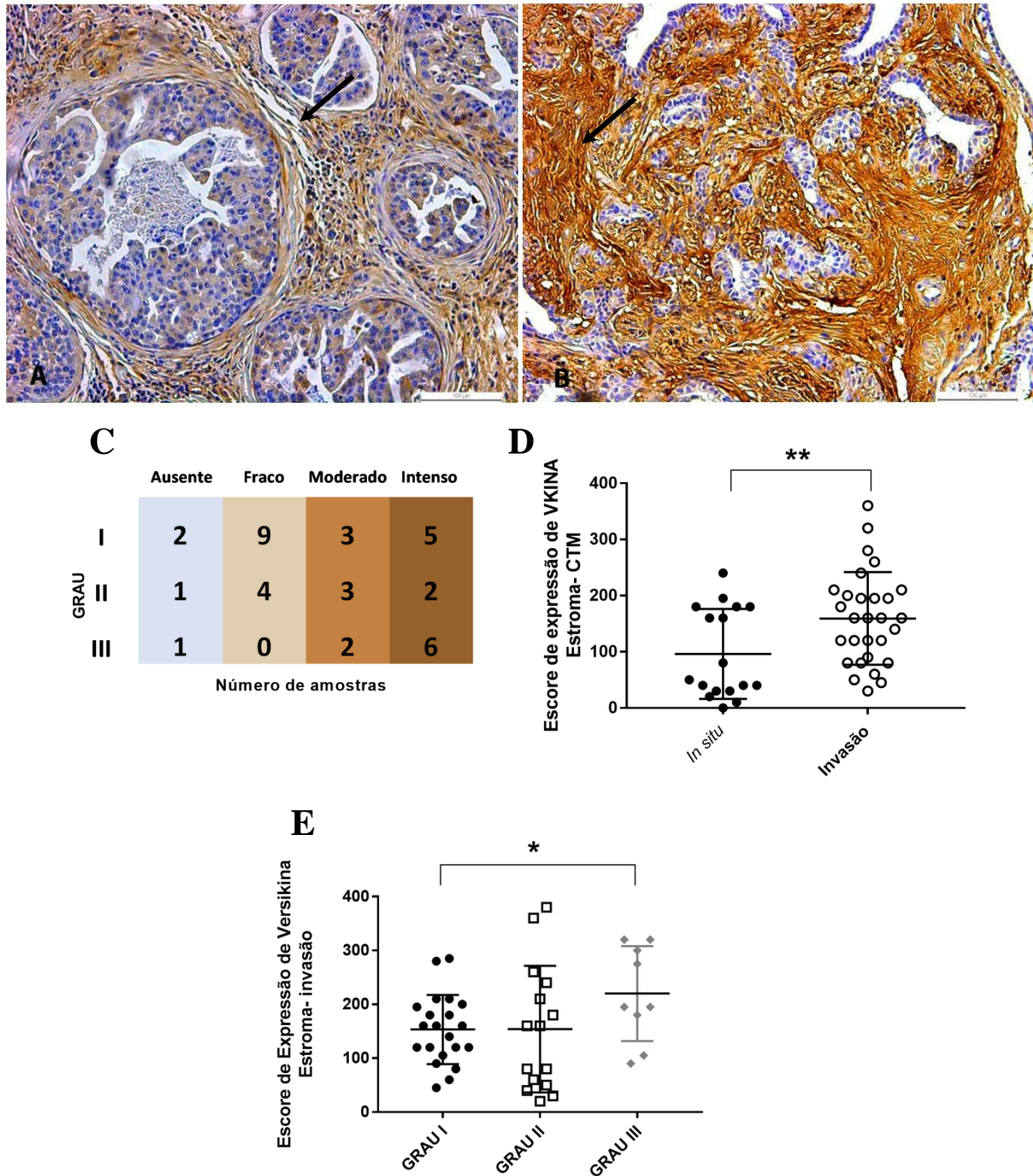


Figura 5. Versikina e fatores clínico patológicos. (A) Expressão de VKINA em áreas carcinomatosas *in situ* em carcinomas em tumores mistos, 20 x. (B) Expressão de VKINA no estroma de áreas adjacentes a invasão carcinomatosa (20x). (A e B) Contra-coloração com hematoxilina de Mayer. (C) Número de amostras distribuídas pela intensidade de marcação

epitelial de VCAN conforme o grau histológico. **(D)** Diferença de expressão de VKINA em estroma entre áreas carcinomatosas *in situ* e de invasão em carcinomas em tumores mistos ($p=0,0048$, Teste de Wilcoxon). **(E)** Expressão de VKINA em células epiteliais conforme o grau histológico. Diferença de expressão de VCAN entre grau I e grau III ($p=0,0178$, teste de Mann-Whitney). Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

5.3.3 Sensibilidade e Especificidade de VCAN e VKINA como marcadores prognósticos

Os casos avaliados quanto à expressão imuno-histoquímica de VCAN e VKINA foram divididos em grupos de acordo com o grau histológico (I, II e III), IPN <3,4, 3,41-5,4 e >5,41) ou presença e ausência de metástase (regional ou distante), independentemente do tipo histológico.

A partir da análise de VKINA no estroma de áreas de invasão conforme o grau histológico dos tumores, foi possível determinar o escore de expressão que divide os grupos em grau I e grau III (cut-off =170). O ponto de corte encontrado por meio da curva ROC (Figura 6C) apresentou sensibilidade de 77,78% e especificidade de 70% (Figura 6D) na distinção entre os nódulos de grau I e grau III. Não houve diferença estatística quando a expressão de VKINA foi avaliada entre tumores de grau I e grau II (Figura 6 A e B). Quando a mesma avaliação foi executada a partir dos escores de expressão de VCAN, não foi possível encontrar um ponto de corte que diferenciasse as amostras conforme o grau histológico (Apêndice D).

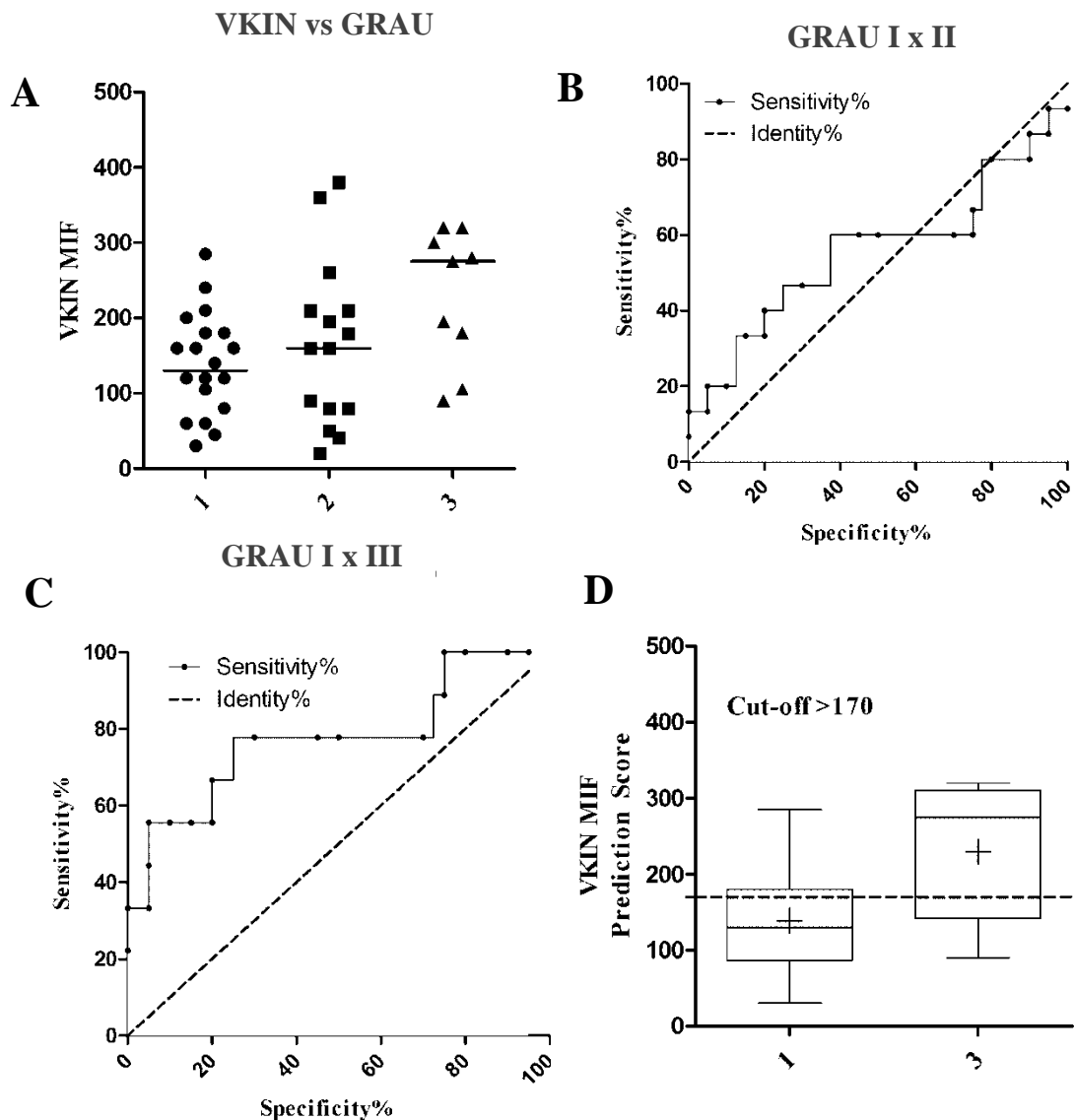


Figura 6. Sensibilidade e especificidade de VKINA como marcador de grau histológico. (A) Diferença de expressão de VKINA conforme grau histológico ($p=0,692$, Kruskal Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn). (B) Análise da curva ROC comparando o valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica de VKINA aos graus histológicos I e II. Área=0,5567; Desvio padrão=0,1064; 95% intervalo de confiança= 0,3600 - 0,7633); Valor de $p=0,5710$. (C) Análise da curva ROC comparando o valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica de VKINA aos graus histológicos I e III. Área=0,7750; Desvio padrão:0,1049; 95% intervalo de confiança =0,5693 – 0,9807. (D) Diferença de expressão de VKINA entre grupos de grau histológico I e III (Ponto de corte: 170). Sensibilidade (77,78%): 95% Intervalo de confiança = 39,99%-97,19%. Especificidade (70%): 95% intervalo de confiança=45,72% a 88,1%. Acurácia foi mensurada pela área sob a curva ROC (AUC). O AUC com significância acima de 0,5 representa um teste válido.

As curvas ROC comparativas entre o Índice prognóstico de Nottingham (IPN) e os escores de expressão de VCAN ou VKINA não revelaram especificidade e sensibilidade significativas (Apêndice E). Também não houve diferença estatística entre os grupos de bom prognóstico, prognóstico moderado ou ruim quanto à expressão de VCAN ou VKINA (Apêndice E).

Por último, por meio da curva ROC não foi encontrado ponto de corte nos escores de VCAN ou VKINA capaz de distinguir os grupos com ou sem metástase (Figura 7), porém todos os casos com metástase a distância faziam parte do grupo de alta expressão de VCAN (Apêndice A). Também não houve diferença estatística ao comparar os grupos quanto a expressão de VCAN ($p=0.1703$) ou VKINA ($p= 0.1052$), contudo as medianas dos escores de expressão de VCAN foram maiores nos grupos com metástase (mediana= 320, $n=7$) frente ao grupo que não apresentou metástase (para linfonodo ou a distância) (mediana=210, $n=35$).

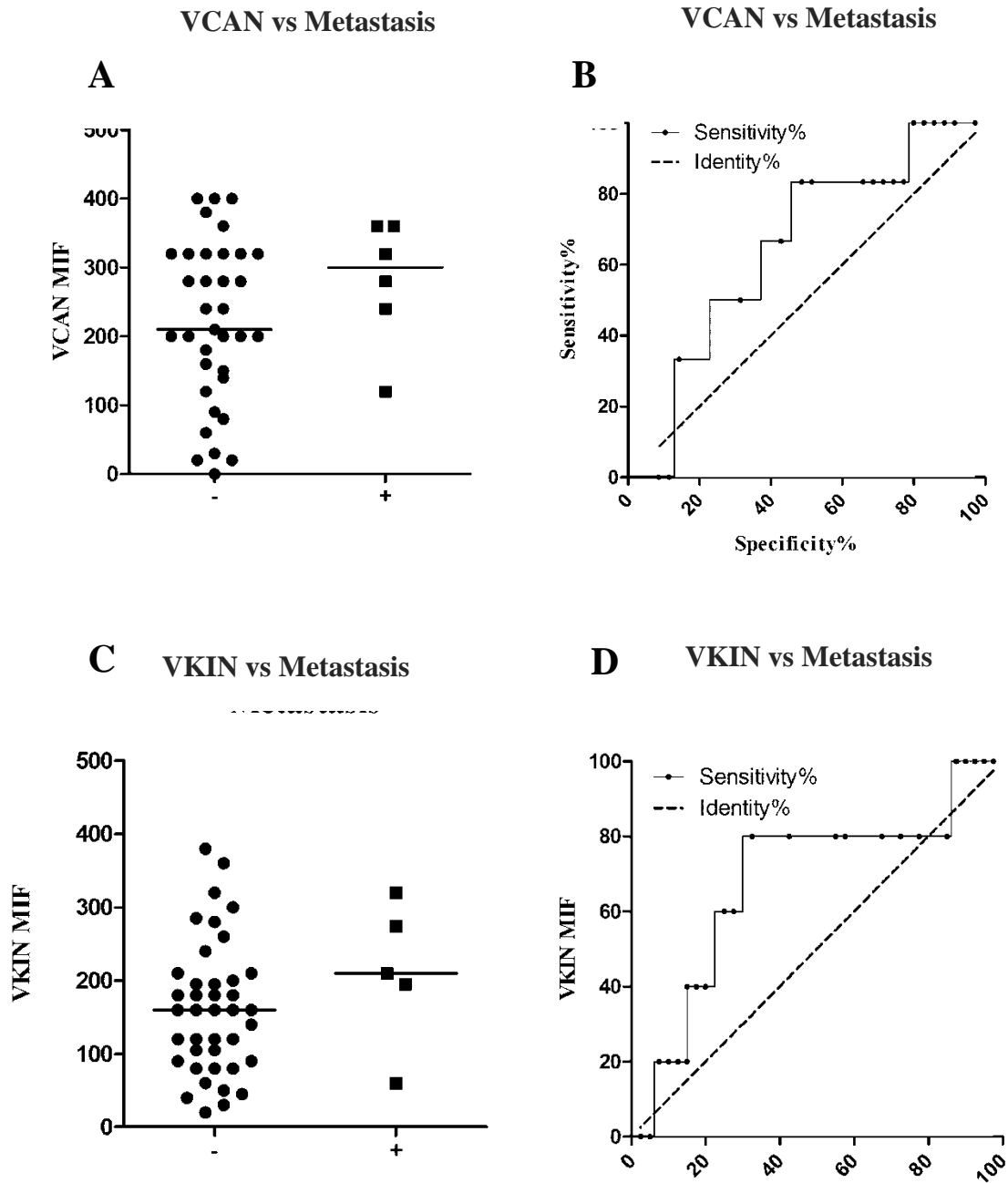


Figura 7. Expressão de VCAN e VKINA em pacientes caninas com e sem metástase. (A) Expressão de VCAN em grupos com (+) e sem metástase (-) ($p=0,2507$, teste de Mann Whitney). **(B)** Análise da curva ROC de acordo com expressão imuno-histoquímica de VCAN em cadelas com e sem metástase. Área= 0,6500; Desvio padrão=0,1101; 95% intervalo de confiança = 0,4341 – 0,8659); Valor de $p= 0, 2453$. **(C)** Expressão de VKINA em grupos com (+) e sem metástase (-) ($p=0,1990$, teste de Mann Whitney). **(D)** Análise da curva ROC de acordo com expressão imuno-histoquímica de VKINA em cadelas com e sem metástase. Área= 0,6800; Desvio padrão=0,1349; 95% intervalo de confiança = 0,4155 – 0,9445); Valor de $p= 0, 1936$. Acurácia foi mensurada pela área sob a curva ROC (AUC). O AUC com significância acima de 0,5 representa um teste válido.

5.4 DEGRADAÇÃO DA MEC: EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ADAMTS E ANÁLISE DE COLÁGENO EM CTM E CSS

5.4.1 Caracterização do perfil de expressão de enzimas ADAMTS 1, 5, 8, 9 e 15

Na análise da expressão de ADAMTS 1 foi observada tanto marcação em citoplasma de células carcinomatosas, quanto em estroma intratumoral (Figura 8 A e B). Contudo, cerca de 51,2 % das amostras não apresentaram reatividade para essa enzima (Figura 9). Mesmo nas amostras positivas, tanto em CTM quanto em CSS, houve baixa expressão de ADAMTS 1 comparada às demais enzimas da mesma família (Figura 9). Foi possível observar uma correlação negativa moderada entre a expressão de ADAMTS 1 no estroma adjacente às áreas *in situ* e a marcação epitelial de VKINA nessas mesmas áreas ($p=0,037$, $r= -0.4272$), contudo não houve correlação entre os escores de expressão de ADAMTS-1 e os parâmetros clínico patológicos analisados (presença de metástase à distância ou em linfonodo, grau histológico, IPN, estadiamento clínico, tamanho). Para esta análise, um total de 41 amostras foram avaliadas, seis amostras foram excluídas por perda das secções histológicas ou presença de marcação de fundo inespecífica (Background).

A expressão de ADAMTS 5 foi observada em citoplasma de células epiteliais malignas, em estroma intratumoral e, por vezes, em algumas células inflamatórias (Figura 7 C e D). A análise da marcação revelou que, em ambos os tipos histológicos, o padrão foi predominantemente epitelial citoplasmático (Figura 9), contudo CSSs revelaram maior expressão em epitélio maligno *in situ* e invasor quando comparados aos CTMs (Figura 10 A e B). No estroma (Figura 10 C), ADAMTS 5 mostrou-se mais expressa em CTMs, e apresentou correlação positiva com a presença de VKINA quando expressa no estroma adjacente às áreas *in situ* ($p=0.035$, $r=0.5233$), independente do tipo tumoral. A avaliação da expressão dessa enzima foi realizada em 31 casos de CTMs e CSSs e os demais casos foram excluídos pelos mesmos motivos citados anteriormente.

A presença de ADAMTS-8 foi observada em 31 casos de CTMs e CSSs, os quais revelaram um perfil de expressão predominantemente citoplasmático em células carcinomatosas, além de marcação em estroma intratumoral adjacente às áreas *in situ* e de invasão (Figura 9 C e D). Ao comparar os tipos tumorais, CSSs revelaram maior expressão em epitélio invasor que CTMs (Figura 10 D e E). Nas áreas de invasão, a expressão de

ADAMTS-8 no estroma foi diretamente correlacionada à expressão de VKINA nessas mesmas áreas ($p=0,035$, $r=0,5232$)

A expressão de ADAMTS -9 foi avaliada em 32 amostras de CTMs e CSSs. Assim como as anteriores, esta enzima apresentou marcação em células epiteliais neoplásicas, bem como marcação em estroma intratumoral (Figura 8 G e H) e, por vezes, em células inflamatórias. Áreas de invasão demonstraram expressão mais fraca ou ausente comparada às áreas *in situ*, em ambos tipos tumorais (Figura 9). Ao comparar CTMs e CSSs, a relação da ADAMTS-9 com comportamento tumoral menos agressivo fica mais evidente. Maiores escores de marcação da enzima foram encontrados em CTMs quando comparados aos CSSs ($p=0.0001$) (Figura 10 F e G).

Dentre as enzimas avaliadas, ADAMTS-15 foi a que mais apresentou variação no perfil de expressão. Foi possível encontrar marcação epitelial citoplasmática, marcação nuclear, bem como em estroma e em células inflamatórias, tais como linfócitos e plasmócitos (Figura 8 I e J). A marcação de ADAMTS -15 em células carcinomatosas foi maior em CSSs quando comparada aos CTMs ($p=0.0001$) (Figura 10 H). Não houve correlação entre ADAMTS-15 e VCAN, porém a expressão de VKINA no epitélio de lesões *in situ* foi fracamente correlacionada à marcação de ADAMTS-15 em estroma de áreas de invasão ($p=0.0393$, $r=0.332$).

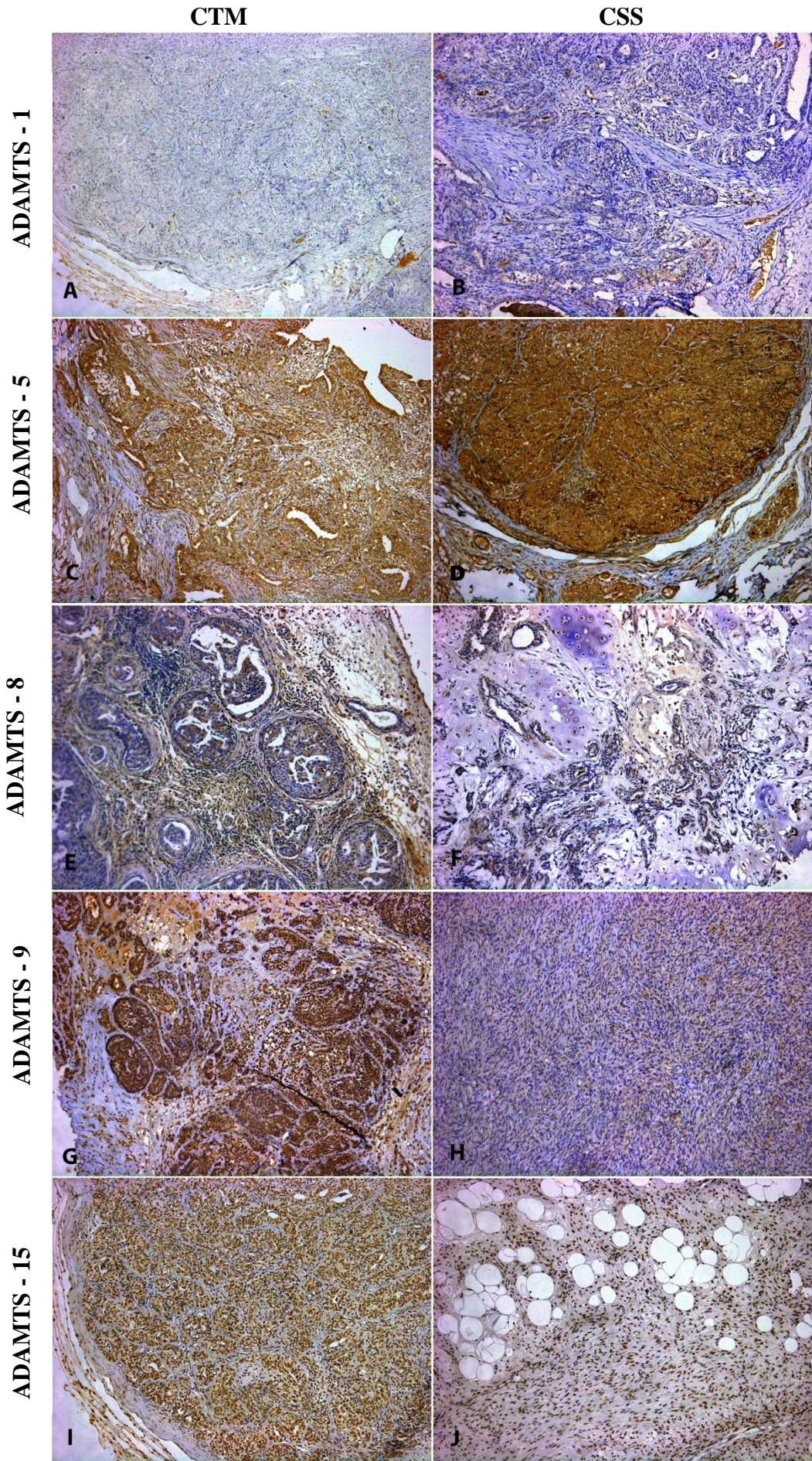


Figura 8. Expressão imuno-histoquímica das Enzimas ADAMTS em CTM e CSS. A e B- Fraca expressão de ADAMTS-1, 10x. **C e D** - Forte marcação citoplasmática de ADAMTS-5 em células epiteliais neoplásicas, 10x. **E e F**- Expressão de ADAMTS-8 em citoplasma e estroma, 10x. **G**- Forte expressão de ADAMTS-9 em CTM,10x. **H**- Moderada marcação de ADAMTS-9 em CSS,10x. **I e J** - Expressão citoplasmática e nuclear de ADAMTS-15,10x. As lâminas foram contracoradas com em Hematoxilina.

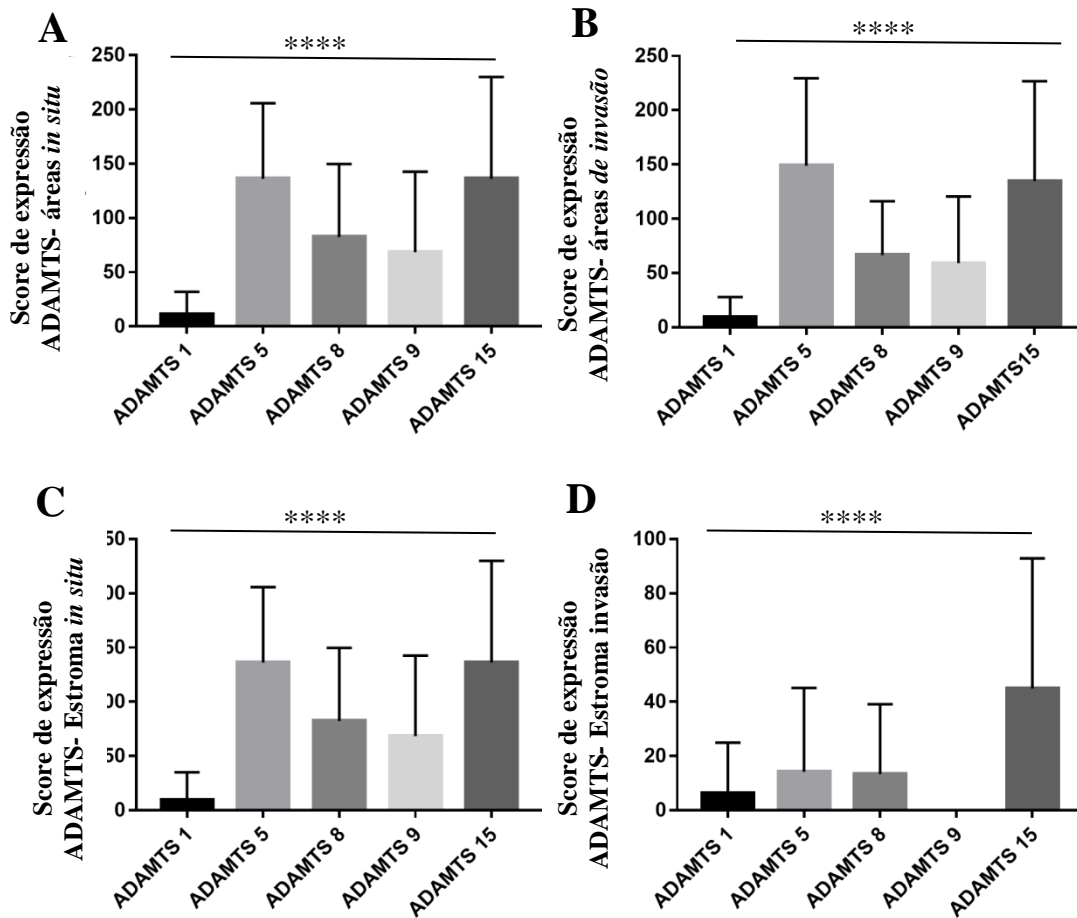


Figura 9. Expressão das enzimas ADAMTS em células epiteliais e Estroma. (A) Escore de expressão epitelial das enzimas ADAMTS em áreas carcinomatosas *in situ*. **(B)** Escore de expressão epitelial das enzimas ADAMTS em áreas de invasão ($p < 0,0001$, teste de Kruskal Wallis). **(C)** Escore de expressão das enzimas em estroma vizinho às lesões *in situ* **(D)** Expressão das ADAMTS no estroma de áreas de invasão carcinomatosa. Teste Kruskal Wallis. **** $p < 0,0001$. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

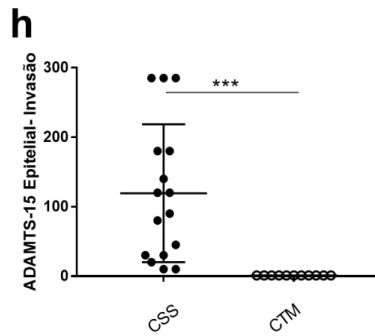
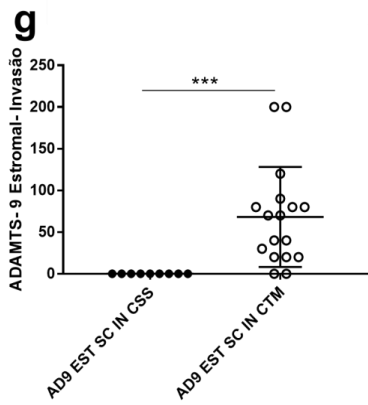
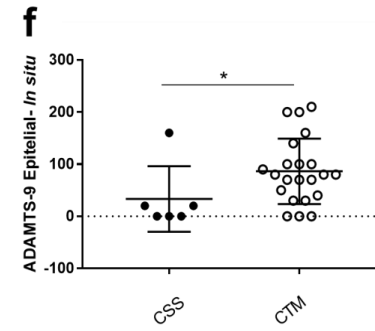
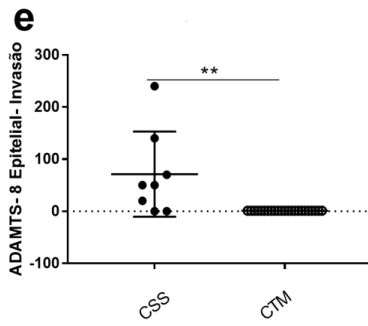
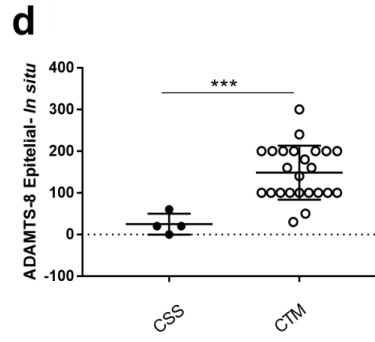
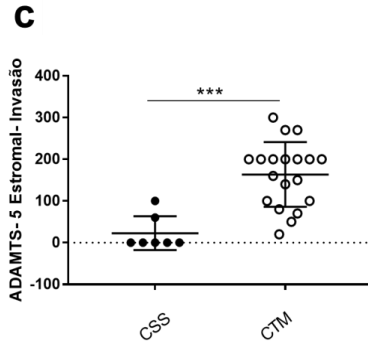
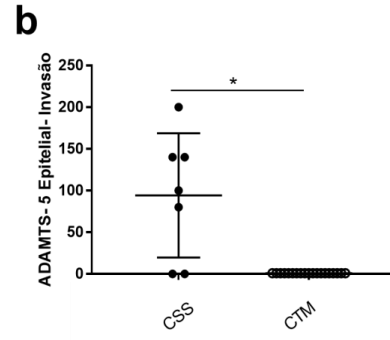
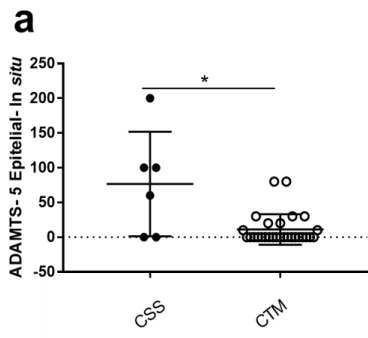


FIGURA 10. Expressão das enzimas ADAMTS em CTM e CSS (a) Expressão epitelial de ADAMTS-5 nas áreas *in situ* de CTM e CSS. (b) Expressão epitelial de ADAMTS-5 em áreas de invasão carcinomatosa em CTM e CSS. (c) Expressão de ADAMTS-5 em estroma adjacente às áreas de invasão em CTM e CSS. (d) Expressão epitelial de ADAMTS-8 em lesões *in situ* de CTM e CSS. (e) Expressão epitelial de ADAMTS-8 em áreas de invasão em CTM e CSS. (f) Expressão epitelial de ADAMTS-9 em áreas *in situ* em CTM e CSS. (g) Expressão de ADAMTS-9 no estroma adjacente às áreas de invasão em CTM e CSS. (h) Expressão epitelial de ADAMTS-15 em áreas de invasão em CTM e CSS. Teste Mann Whitney. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05. * $p < 0,05$ ** $<0,001$ *** $<0,0001$.

5.4.2 Caracterização morfológica de colágeno na matriz extracelular tumoral e correlação com proteólise de VCAN

Para caracterizar o estroma conjuntivo adjacente às áreas de proliferação epitelial e correlaciona-lo à proteólise de VCAN, foi analisado o padrão das fibras de colágeno por meio das colorações especiais de Tricrômico de Masson e Picrosirius Red.

Na coloração de Tricrômico de Masson foi possível quantificar o colágeno “total” nas áreas *in situ* e de invasão nos CTMs e CSSs (Tabela 3), no intuito de correlacionar a área total e intensidade do colágeno à proteólise de VCAN. Na quantificação da área total, incluindo áreas *in situ* e de invasão, os CTMs apresentaram áreas maiores de deposição de colágeno que CSSs ($p= 0,0068$). Nesta análise foi possível observar que a área de colágeno adjacente às regiões de invasão (Figura 11 B) foi maior em CSS do que em CTM ($p= 0.0342$).

Na análise da coloração de Picrosirius Red (Figura 11D, E e F), o colágeno tipo I foi ligeiramente mais abundante em CSS e o colágeno tipo III esteve presente em maior quantidade nas áreas de invasão dos CTMs ($p= 0.0275$). Ao avaliar as médias de colágeno tipo III entre os grupos histológicos (Tabela 3), notou-se que CTMs (Média= 22.640,50) possuía mais colágeno tipo III em áreas de invasão que CSSs (Média= 14.033,94), o mesmo se repete com relação ao colágeno total (*in situ* + invasor).

Foram encontradas correlações inversas significativas entre a intensidade de colágeno adjacente às áreas *in situ* e expressão de VKINA em células carcinomatosas nas mesmas áreas ($p= 0,0173$, $r= -0,4542$), bem como entre colágeno tipo III e expressão de VCAN também em células carcinomatosas de áreas *in situ* ($p=0.0139$, $r= -0,4951$).

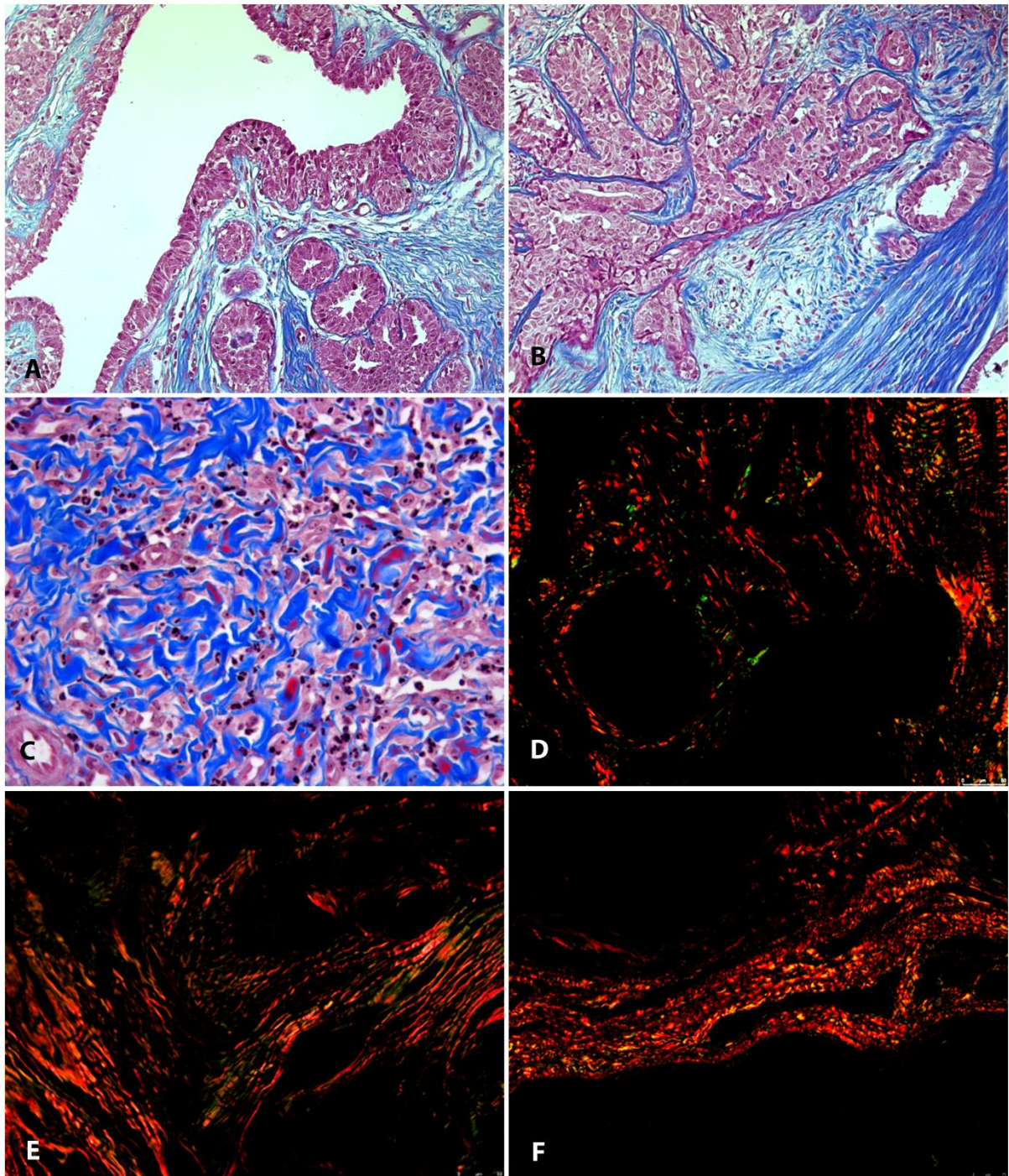


Figura 11. Colorações especiais. Coloração em Tricrômico de Masson revelando deposição de colágeno no estroma adjacente às áreas *in situ* em CTM, 200x (A), às áreas de invasão em CTM, 100x (B) e às áreas de invasão em CSS, 200x (C). Coloração em Picrosirius Red revelando deposição de colágeno tipo I (em vermelho) e tipo III (em verde) no estroma adjacente às áreas *in situ* em CTM, 200x (D), às áreas de invasão em CTM, 200x (E) e às áreas de invasão em CSS, 100x (F).

	Picrosissius Red						Tritômico de Masson					
	IN SITU		INVASOR		GERAL		IN SITU		INVASOR		GERAL	
	Col. I	Col. III	Col. I	Col. III	Col. I	Col. III	Área	Intensidade	Área	Intensidade	Área	Intensidade
CTM												
<i>Média</i> ±	11.721±	21.293±	14.699±	22.640±	14.137±	21.762±	14.498±	108.89±	19.219±	99.48±	17.236±	102.80±
<i>Mediana</i>	11.102	17.262	13.153	13.372	5.081	18.264	286.30	107.80	18.096	97.42	16.177	101.24
	6.749	19.394	12.528	18.130	12.528	12.965	6.887	17.23	7.214	13.29	6.950.70	14.71
CSS												
<i>Média</i> ±	16.335±	14.033±	16.917±	13.831±	—	—	—	—	22.805±	95.82±	22.348±	96.08±
<i>Mediana</i>	12.079	11.916	12.079	11.916	17.677	10.473	18.044	10.144	23.102	94.22	23.102	94.22
	17.677	10.473	18.044	10.144	4.512	16.41	5.139	16.95				

Tabela 3. Quantificação e classificação das fibras de colágeno em CTM e CSS

Col. I – Colágeno tipo I

Col. III – Colágeno tipo III

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO TUMORAL E SUA CORRELAÇÃO COM A PROTEÓLISE DE VCAN

5.5.1 Avaliação do infiltrado de macrófagos

Na análise imuno-histoquímica, a média de células CD68+ em CTM foi de 37,4, enquanto CSS tiveram média de 25,2 macrófagos por campo, contudo não houve diferença estatística significativa. Ao avaliar a relação com proteólise, um número considerável de células CD68+ pôde ser observado nas áreas adjacentes à expressão de VKINA (Figura 12A), porém não foi possível encontrar uma correlação significativa. A avaliação da expressão de VCAN também não revelou correlação com o número de células CD68+.

Já na contagem diferencial de macrófagos em HE, foi possível constatar um maior número de macrófagos correlacionado com alta expressão de VKINA ($p=0.0479$, $r=0,4721$) (Figura 12B).

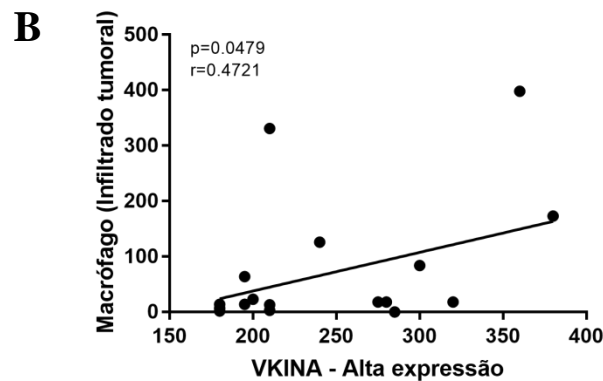
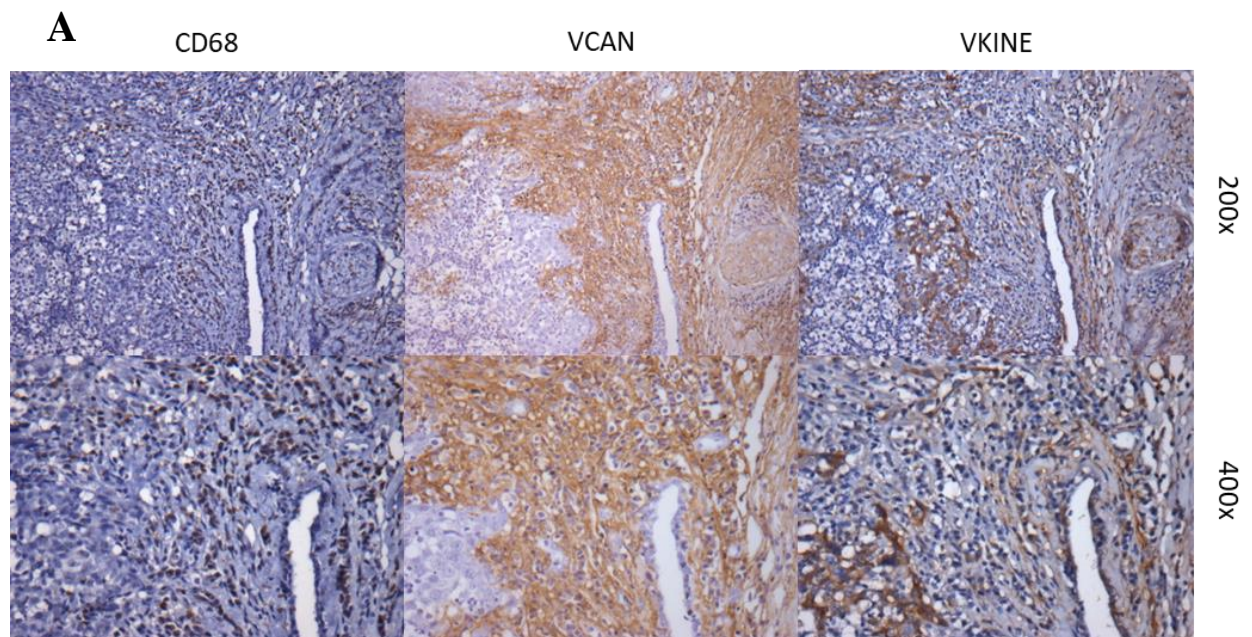


Figura 12. Correlação entre a expressão de VKINA e infiltrado de macrófagos. (A) Marcação imuno-histoquímica de CD68 (esquerda) em infiltrado inflamatório intratumoral. Aumento de 20x e 40x. Expressão de VCAN em estroma intratumoral (centro). Aumento de 20x e 40x. Expressão de VKINA em estroma intratumoral (esquerda) e citoplasmática em células carcinomatosas. Aumento de 20x e 40x. **(B)** Correlação entre a presença de macrófagos no infiltrado tumoral (contagem diferencial em HE) e expressão de VKINA ($p=0,0479$, $r=0,4721$, Correlação de Spearman).

5.5.2 Avaliação do infiltrado de linfócitos intratumorais

A presença de VKINA no estroma dos casos estudados esteve correlacionada à frequência de linfócitos tanto em sangue periférico como no infiltrado inflamatório tumoral. Todavia, VCAN não foi associado às células inflamatórias em nenhuma das análises realizadas.

Na contagem diferencial de células inflamatórias em HE foi observado que o número de linfócitos do infiltrado tumoral é diretamente proporcional à presença de Versikina ($p=0,0350$, $r=0,5176$) (Figura 13 C). E, na contagem diferencial em sangue periférico, essa correlação permaneceu a mesma, ou seja, quanto maior a imunomarcagem de VKINA, maior o número de linfócitos circulantes ($p=0,0059$, $r=0,4623$) (Figura 13A). Quando foram analisados os casos de alta e baixa expressão de VKINA, ou seja, com escores acima ou abaixo do valor de mediana, o número de linfócitos em sangue periférico permaneceu maior nos casos que exibiram alta expressão do proteólito ($p=0,0007$) (Figura 13B). O infiltrado de plasmócitos intratumorais também se mostrou correlacionado à presença de proteólise de VCAN ($p= 0,0448$, $r= 0,3232$) (Figura 13D).

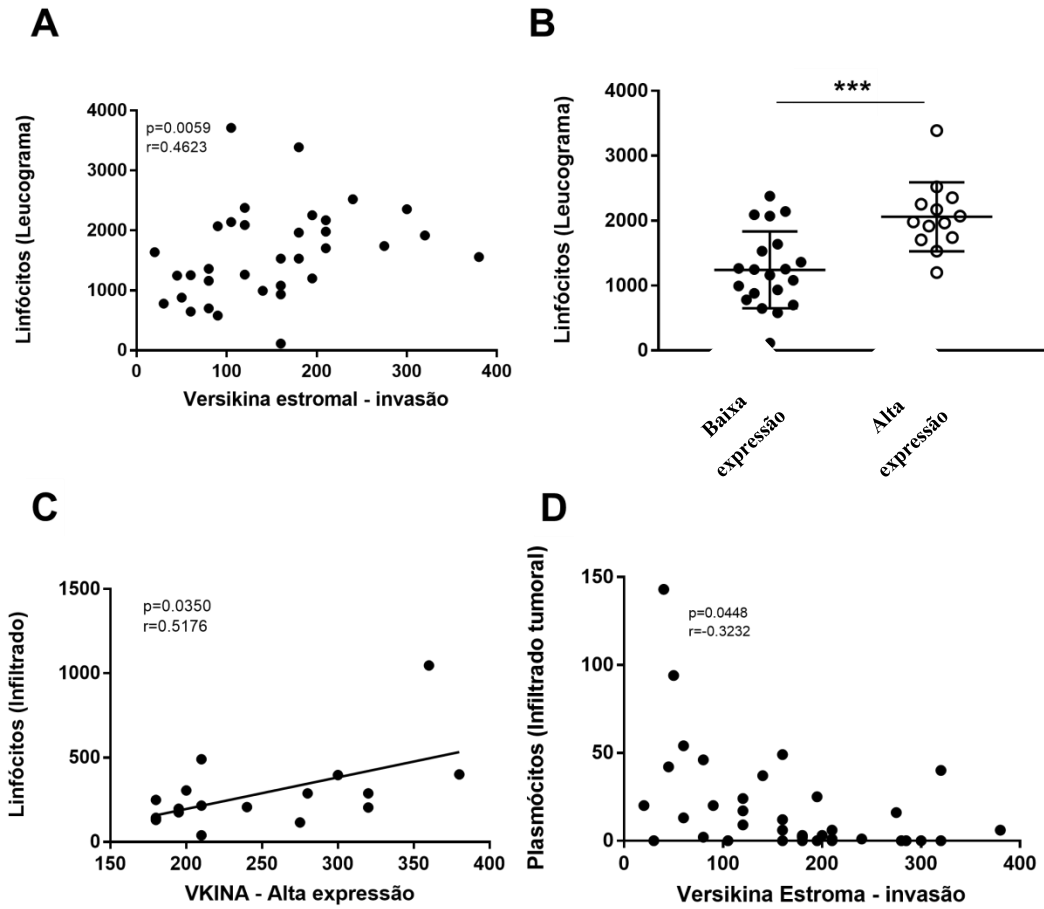


Figura 13. Relação entre a proteólise de VCAN e número de linfócitos. (A) Relação entre expressão de VKINA no estroma adjacente às áreas de invasão e número de linfócitos provenientes do leucograma das pacientes caninas com carcinomas mamários (Teste Correlação de Spearman). (B) Diferença do número total de linfócitos (leucograma) entre casos com alta e baixa expressão de VKINA ($p=0,0007$, teste Mann Whitney). (C) Correlação entre infiltrado tumoral de linfócitos e alta expressão de VKINA. (D) Correlação entre número de plasmócitos no infiltrado tumoral e imunomarcção de VKINA em áreas de invasão.

5.6 SOBREVIDA

Considerando o tipo histológico, a sobrevida livre da doença foi mais longa em cadelas com diagnóstico de CTM (mediana aos 450 dias) quando comparadas àquelas com CSS (mediana aos 230 dias), contudo não houve diferença estatística significativa ($p=0,0689$) (Figura 14). Resultados semelhantes foram observados entre as medianas dos casos com alta e baixa expressão de VCAN ($p=0,1374$) (Figura 16B), bem como de VKINA ($p=0,2219$) (Figura 16 C). Contudo, cadelas diagnosticadas com grau I apresentaram maior tempo de sobrevida quando comparadas aquelas com grau III (0,0423), especialmente as que tiveram grau I e escore de VKINA abaixo de 170 quando comparadas às diagnosticadas com grau III e escore acima de 170 (*cut-off* definido pela curva ROC). A análise de sobrevida foi realizada em 47 animais dos quais, 42,5% ($n=20$) morreram durante o estudo, 40,4% permaneceram vivos e 17,0% ($n=8$) foram consideradas censuradas devido à perda de acompanhamento e morte não relacionada ao tumor.

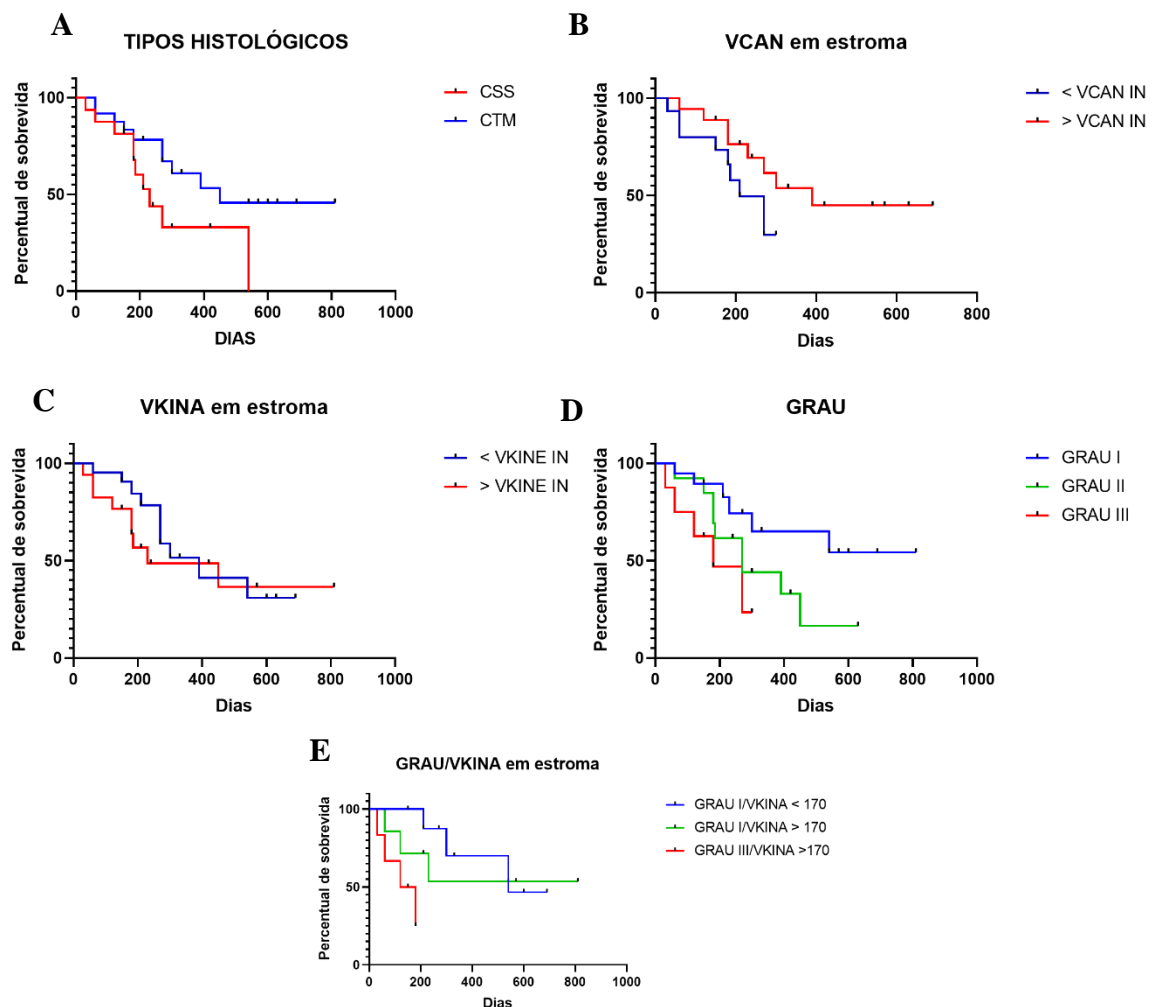


Figura 14. Sobrevida. (A) Paineis de curvas de sobrevida das cadelas com tumores mamários segregadas quanto ao tipo histológico. (B) Expressão de VCAN (baixa versus alta expressão). (C) expressão de VKINA (baixa versus alta expressão). (D) grau histológico (E) e grau relacionado ao *cut-off* definido pela curva ROC. As curvas de sobrevida foram estimadas com o método Kaplan-Meier seguido por Log-rank teste.

6 DISCUSSÃO

Apesar de Versican ser considerado um dos componentes da MEC mais estudados no câncer de mama humano (Canavese *et al.*, 2011), pouco se sabe a respeito da influência da sua proteólise na progressão tumoral. Alguns estudos evidenciam que os fragmentos bioativos de VCAN (matriquinas) gerados pela ação das enzimas ADAMTS, podem contribuir para regulação do infiltrado inflamatório e resposta imune antitumoral em variadas neoplasias. Versikina, o mais bem caracterizado desses proteólitos, está associada à presença de células Batf3-DC intratumorais e com infiltrado de células T em diversas neoplasias, tanto sólidas como hematopoiéticas (EMMERICH *et al.*, 2018; HOPE *et al.*, 2019). Entretanto, até o presente momento, o potencial imunestimulatório de VKINA ainda não foi explorado no contexto do câncer de mama humano ou em modelo canino.

No presente estudo, foi possível notar expressão imuno-histoquímica de VCAN em toda as amostras avaliadas de CTMs e CSSs, sendo esta expressão predominantemente em estroma peritumoral. Em CTMs, uma imunomarcção proeminente de versican foi observada em estroma associado às áreas de invasão, corroborando os dados de Damasceno e colaboradores (2012) que ao estudar o CTM também verificaram associação desta molécula a invasividade. Previamente, Ricciardelli e colaboradores (2002), ao analisar VCAN em carcinomas mamários de mulheres, perceberam que sua expressão era mais evidente e difusa ao redor de áreas malignas, ao passo que o estroma que circundava áreas consideradas benignas apresentou imunorreatividade irrisória para o proteoglicano. No grupo dos CSS, não foi encontrada diferença de expressão de VCAN entre áreas consideradas *in situ* e áreas de invasão, reforçando a natureza mais agressiva dos CSS, sendo observada, inclusive, expressão em áreas de proliferação neoplásica contida por membrana basal, assim como ocorre em mulheres (TOKUDORNE *et al.*, 2005; LAKSHMI, *et al.*, 2020).

Curiosamente, além da marcação no estroma já conhecida do seu precursor VCAN, VKINA esteve fortemente presente no citoplasma de células epiteliais malignas (75% dos casos apresentaram marcação epitelial de VKINA, enquanto apenas 16,6% tiveram expressão epitelial de VCAN), além disso não foi observada correlação entre a presença de VKINA e VCAN. Estudos anteriores também demonstraram que VKINA pode ter uma localização distinta de VCAN. McCulloch e colaboradores (2009), por exemplo, demonstraram no tecido interdigital embrionário que VKINA foi expressa no citoplasma de células destinadas a sofrer apoptose para regressão desse tecido, enquanto a forma íntegra de VCAN foi pouco expressa nessa região e limitada à outras áreas do membro. Outro estudo também demonstrou

localização distinta e específica de VKINA com relação a VCAN, sugerindo um processo de relocação da VKINA livre para o interior das células endoteliais, em modelo murino de câncer de mama, por mecanismos ainda não conhecidos (Asano *et al.*, 2017). Esses achados indicam que, possivelmente, VKINA assume funções independentes da forma intacta de VCAN, gerando hipóteses para sua origem no citoplasma de células neoplásicas em nosso estudo. As células neoplásicas podem ser capazes de sintetizar VKINA ou essa matriquina poderia ser relocada para o interior das células carcinomatosas como sugerido por Asano e colaboradores (2017). Considerando que, até o presente momento, a única via de geração de VKINA é a proteólise de VCAN, acredita-se que a translocação deste proteólito do estroma para o interior das células neoplásicas seja a hipótese mais forte.

Quanto aos parâmetros clínico-patológicos, observou-se que tumores de grau histológico III, os quais apresentam características mais agressivas (ELSTON; ELLIS.,1991) exibiram maior expressão de VCAN em células epiteliais quando comparados aos tumores de grau I ($p=0,0403$). A associação da expressão epitelial de VCAN com os maiores graus histológicos também foi encontrada por De Wit e colaboradores (2013) no câncer colorretal, onde foi possível perceber também a associação da expressão epitelial de VCAN com a maior dimensão dos tumores com diferenciação mucinosa. Já em relação a VKINA, até o presente momento não existem dados publicados que apontem sua relação com o grau histológico, porém no que diz respeito a sobrevida, pacientes com mieloma múltiplo pós-transplantados tiveram maior sobrevida global e maior sobrevida livre de progressão quando a marcação de VKINA foi mais discreta (DHAKAL *et al.*, 2019). Em nosso trabalho foi possível perceber que cadelas diagnosticadas com grau I apresentaram maior tempo de sobrevida quando comparadas aquelas com grau III (0,0423), especialmente as que tiveram grau I e escore de VKINA abaixo de 170 quando comparadas às diagnosticadas com grau III e escore acima de 170 (*cut-off* definido pela curva ROC) de maneira semelhante ao descrito por Dhakal e colaboradores (2019) que associou a maior expressão de VKINA a piores prognósticos no mieloma múltiplo.

Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos com e sem metástase, todos os casos que desenvolveram metástase à distância apresentaram alta expressão de VCAN. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores os quais demonstraram que a presença de VCAN está relacionada ao desenvolvimento de metástase tanto em câncer de mama (YEE *et al.*, 2007; DOS REIS *et al.*, 2019), quanto em outros tipos tumorais (VOUTILAINEN *et al.*,2003; SETOGUCHI *et al.*, 2011; PAPADAS *et al.*, 2020). Todavia, no presente estudo

não houve diferença estatística para a expressão desta molécula entre os grupos com e sem metástase. A ausência de diferença estatística pode estar relacionada a perda de segmento de algumas cadelas após a cirurgia (n=14) e a não realização de exame histopatológico em linfonodo.

Ao avaliar VKINA e sua relação aos parâmetros clínico-patológicos, não foi observada diferença estatística da expressão dessa matriquina entre os dois grupos histológicos estudados. Porém, foi possível encontrar maiores níveis de VKINA no grupo histológico de grau III em comparação ao grau I, independentemente do tipo tumoral, no *cut-off* de 170 (escore de expressão de VKINA), revelando sensibilidade de 77,78% e especificidade de 70% para diferenciação destes grupos. Além disso, todos os casos com metástase à distância pertenceram ao grupo de alta expressão de VKINA, semelhante aos trabalhos que associem a proteólise de VCAN a um pior prognóstico (DHAKAL *et al.*, 2019; BISCHER *et al.*, 2020), apesar disso sabe-se que a bioatividade dos proteólitos de VCAN é contexto dependente (TIMMS & MAURICE.,2020).

Pouco se sabe sobre os efeitos da clivagem de VCAN, funções dos fragmentos, ou como essa remodelação da matriz extracelular afeta o microambiente e o fenótipo das células inflamatórias ou tumorais nele presente. Desta forma, buscou-se ainda no presente estudo, após a avaliação de VCAN e VKINA, caracterizar a expressão de enzimas da família ADAMTS e sua relação com a proteólise do proteoglicano.

Na avaliação imuno-histoquímica de ADAMTS 1, observou-se marcação citoplasmática em células tumorais e raramente em estroma, corroborando com os dados de Silva e colaboradores (2016) que também encontraram expressão celular de ADAMTS 1, inclusive no núcleo de células tumorais do câncer de mama em mulheres. Nas amostras analisadas, não foi observada marcação nuclear nas células tumorais. Além disso, a maioria das amostras não revelou expressão dessa enzima, assim como encontrado também por outro grupo de pesquisa que verificou que ADAMTS 1 é pouco expressa no câncer de mama humano (carcinoma ductal invasivo) em comparação a mama normal (Freitas *et al.*, 2013). Em contrapartida, no contexto do mieloma múltiplo, ADAMTS -1 apresentou-se superexpressa e apontada como umas das principais versicanases (Hope *et al.*,2016).

Até o momento, a literatura sugere que ADAMTS 1 é a metaloprotease ADAMTS promotora de tumor mais bem caracterizada (CAL; LÓPEZ-OTÍN, 2015), sendo a sua expressão associada ao desenvolvimento tumoral e a maior risco de metástase óssea em mulheres com câncer de mama (LU *et al.*, 2009). Entretanto, não foi possível encontrar tal associação em cadelas com câncer de mama devido à baixa incidência desse tipo de metástase

na espécie (dentre as amostras estudadas, nenhuma apresentou metástase óssea detectável nos exames radiográficos). Também não foi encontrada correlação entre a presença de ADAMTS -1 e metástase para linfonodo, metástase pulmonar e demais parâmetros clínico patológicos analisados (grau histológico, IPN, estadiamento clínico, tamanho).

Apesar de alguns autores destacarem a ADAMTS 1 por suas atividades pró-tumorais, a literatura traz muitas controvérsias a respeito dessa questão, principalmente no que envolve seu caráter antiangiogênico e capacidade de estimular migração celular (FREITAS *et al.*, 2013; TYAN *et al.*, 2012; ROCKS *et al.*, 2008; IRUELA-ARISPE; CARPIZO; LUQUE 2006). Neste estudo não foi possível observar correlação entre a presença de ADAMTS 1 e a expressão de VCAN ou sua proteólise, em contrapartida, uma correlação negativa moderada entre a expressão de ADAMTS 1 no estroma de áreas *in situ* e a marcação epitelial de VKINA nessas mesmas áreas sinalizam que esta enzima pode não ser principal responsável pela proteólise de VCAN, assim como demonstrado por Santamaria e colaboradores (2019).

No que diz respeito a correlação de ADAMTS-5 com a presença do substrato VCAN e seu proteólito VKINA, a marcação desta enzima no estroma adjacente às áreas *in situ* mostrou correlação positiva com a presença de VKINA também nessas áreas. Santamaria e colaboradores (2019) determinaram pela primeira vez constantes cinéticas da proteólise do versican, chegando à conclusão que ADAMTS-5 é uma versicanase 18 vezes mais potente que ADAMTS-4, enquanto a atividade da versicanase ADAMTS-1 é comparativamente baixa.

ADAMTS -5 apresentou forte marcação tanto em CTMs quanto em CSSs. Em CSSs, a expressão epitelial foi ainda mais evidente, tanto em áreas *in situ* quanto nas áreas de invasão neoplásica, podendo haver uma associação à maior agressividade deste tumor, achado semelhante ao destacado por Haraguch e colaboradores (2016) no câncer colorretal. Porém quando a análise foi feita no estroma, CTMs exibiram maior expressão desta enzima. Pouco se sabe a respeito do papel de ADAMTS-5 no câncer de mama, porém, recentemente um estudo sugeriu que sua baixa expressão neste tipo tumoral em mulheres estava associada a tumores de início tardio (≥ 55 anos) (MALVIA *et al.*, 2019), porém não foi possível observar relação com idade de acometimento nos casos caninos estudados.

ADAMTS-8 não é comumente relacionada à presença de VKINA, porém notou-se que a expressão de ADAMTS-8 em áreas de invasão é diretamente proporcional a expressão de VKINA nessas mesmas áreas. Esse resultado sugere que a geração de VKINA pode ser oriunda de uma ação conjunta contexto-dependente das enzimas ADAMTS como descrito por Timms e Maurice (2020). O perfil de expressão imuno-histoquímica dessa enzima foi em

maior parte epitelial e citoplasmática. A expressão epitelial de ADAMTS-8 foi maior em CSS quando comparadas a CTM, ou seja, ADAMTS-8 destacou-se no tumor de pior prognóstico, além disso mostrou-se fortemente expressa em grande parte das amostras estudadas, diferente do que é descrito na literatura no estudo de outros tumores mamários, cerebrais, gástricos e pancreáticos em humanos (CHOI *et al.*, 2014; DUNN *et al.*, 2006).

ADAMTS -9 também foi expressa nos casos estudados, porém não houve correlação entre a imunomarcção desta ADAMTS com a degradação de VCAN. Muitos trabalhos associam ADAMTS-9 e a proteólise de VCAN em diversos cenários à exemplo da embriogênese (NANDADASA; FOULCER; APTE., 2014) e anomalias cardíacas e aórticas (KERN *et al.*, 2010), porém há pouca informação a respeito da atividade de versicanase de ADAMTS-9 no microambiente tumoral.

Interessantemente, áreas de invasão demonstraram uma evidente fraca expressão ou ausência de marcação em estroma, além disso, ao comparar CTM e CSS, a relação da ADAMTS-9 com comportamento tumoral menos agressivo ficou mais evidente. CTM demonstraram maior expressão de ADAMTS-9 ($p=0,0001$) quando comparados aos CSS. Este resultado está de acordo com o que foi encontrado em linhagens celulares de carcinomas mamários humanos, nos quais ADAMTS-9 demonstrou ser regulado negativamente em carcinomas mamários malignos e invasivos em comparação com não neoplásicos (PORTER, *et al.*, 2004). Estes dados revelam que ADAMTS-9 pode ter um papel que vai além da proteólise de VCAN no microambiente tumoral de tumores mamários caninos e de mulheres.

Nos casos estudados, não foi observada correlação entre ADAMTS-15 e VKINA, porém Dancevic e colaboradores (2013) caracterizaram ADAMTS-15 como uma nova proteoglicanase de VCAN que age provavelmente em sinergia com outros membros da família ADAMTS durante o desenvolvimento cardíaco inicial e desenvolvimento musculoesquelético em camundongos. Na presente pesquisa, a marcação epitelial de ADAMTS-15 foi maior em CSS quando comparada aos CTM, porém em outro estudo, a expressão de ADAMTS-15 foi correlacionada com melhora do prognóstico em mulheres com câncer de mama, redução da motilidade de linhagem celulares de câncer de mama e diminuição da formação de túbulos em linhagem de células endoteliais (PORTER *et al.*, 2006).

Como a matriz extracelular é um agente multitarefa na dinâmica do câncer, a fim de investigar melhor o remodelamento da MEC frente à proteólise de VCAN no microambiente tumoral, caracterizou-se também as fibras de colágeno de áreas *in situ* e de invasão correlacionando-as a presença de VKINA. Sabe-se que pequenos proteoglicanos (PG) ricos

em leucina (SLRPs), incluindo decorina e lumican são conhecidos como mediadores da fibrilogênese e organização do colágeno, porém a função dos grandes PGs, a exemplo de VCAN, sobre o remodelamento das fibras de colágeno ainda é pouco conhecida. Um estudo recente, descobriu que o versican promove a fibrilogênese do colágeno e regula positivamente a compactação e reorganização do colágeno mediada por células (CHEN *et al.*, 2020).

Na presente pesquisa, notou-se uma correlação negativa entre a presença de colágeno tipo III total e VCAN em células epiteliais, porém não foi possível observar relações dignas de notas entre a presença de Versican e as demais variáveis de colágeno avaliadas (áreas, intensidade e classificação de colágeno em tipo I). A correlação negativa entre VCAN e colágeno tipo III pode estar associada ao potencial de VCAN em induzir a compactação das fibras, dessa forma, VCAN estaria mais relacionada às fibras mais compactas como as de colágeno tipo I, não às fibras mais frouxas como o colágeno tipo III (CHEN *et al.*, 2020). Em adição, percebeu-se que a intensidade de colágeno (Tricrômico de Masson) foi menor conforme a expressão de VKINA em áreas carcinomatosas *in situ* aumentava ($p=0,0173$, $r=-0,4542$). Até o momento a literatura não tem dados que relacionem a proteólise de VCAN com características de colágeno, sendo assim necessários estudos mais profundos para entender se tal como VCAN, o seu proteólito também exerce influência no remodelamento do colágeno, sendo esse mais um possível mecanismo por meio do qual proteoglicanos de matriz atual na progressão do câncer.

O alinhamento e a conformação das fibras de colágeno têm significado clínico em uma variedade de cânceres e em outras doenças que são acompanhadas de fibrose. As denominadas assinaturas de colágeno associadas ao tumor (TACs), são padrões de colágeno capazes de indicar determinados desfechos na progressão de neoplasias mamárias em mulheres e também em cadelas (CASE, *et al.*, 2017; CONKLIN *et al.*, 2011). Um trabalho recente demonstrou que a coloração das fibras de colágeno com Picrosirius red, sob luz polarizada, pode ser um excelente método de rotina para avaliação das assinaturas de colágeno em neoplasias mamárias humanas, podendo substituir inclusive métodos mais robustos como a microscopia de geração de segundo harmônico (NATAL *et al.*, 2019).

Além da relação com a proteólise de VCAN, também se avaliou a característica das fibras de colágeno de acordo com o tipo histológico. Sob a luz polarizada, Picrosirius red evidencia fibras com maior entrelaçamento e maior espessura (coloração vermelho-alaranjada), essas fibras são classificadas como colágeno tipo I (colágeno maduro), já as fibras mais finas e menos entrelaçadas apresentam-se com coloração esverdeada e são denominadas colágeno tipo III (colágeno imaturo). CTM possui mais colágeno tipo III em áreas de invasão

que CSS, o mesmo se repete com relação ao colágeno total (*in situ* + invasor). Já o colágeno tipo I é ligeiramente mais abundante em CSS. Em CTM, o colágeno tipo III parece predominar quanto ao colágeno tipo I, enquanto no grupo dos CSS o tipo I é mais presente.

Segundo estudo que avaliou a expressão de mRNAs de colágeno tipo I e III de tumores mamários benignos e diferentes graus e estágios de carcinoma ductal invasor, o aumento de expressão desses dois subtipos de colágeno fibrilar estão associados à piores prognósticos no câncer de mama (KAUPPILA *et al.*, 1998). O aumento da expressão de pró-colágenos fibrilares do tipo I e do tipo III possivelmente é um dos mecanismos de remodelamento da MEC que influencia na invasão neoplásica, porém não encontramos diferenças estatísticas que demonstrassem essa relação nos CTM e CSS. A formação de feixes de colágeno aberrante pode estar associada ao aumento da sua síntese no microambiente tumoral, tornando-as mais facilmente degradáveis facilitando a mudança da conformação e organização das fibras, bem como a invasão do tumor de mama.

Outra etapa importante desse estudo foi a avaliação do infiltrado inflamatório tumoral mediante à forma íntegra de VCAN e seu proteólito, VKINA. A maioria dos estudos acerca da proteólise de Versican relatam uma característica imunorregulatória em comum, a capacidade dessa matriquina de promover a infiltração de células T no microambiente tumoral (PAPADAS *et al.*, 2020; DHAKAL *et al.*, 2019; HOPE *et al.*, 2017; PAGENKOPF *et al.*, 2017; DEMING *et al.*, 2017; HOPE *et al.*, 2016). No presente trabalho também se observou nos casos com alta expressão de VKINA que quanto maior o infiltrado linfocítico maior a presença de VKINA, sugerindo que as propriedades imunoestimulatórias de VKINA, já descritas em mieloma múltiplo e câncer colorretal humano (HOPE *et al.*, 2017; HOPE *et al.*, 2016), possam ser semelhantes em tumores mamários em modelo canino. Além disso, a expressão de VKINA em estroma adjacente à proliferação tumoral foi diretamente proporcional à contagem de linfócitos no leucograma. O número de linfócitos em sangue periférico permaneceu maior nos casos que exibem alta expressão do proteólito. Segundo Hope e colaboradores (2017), no carcinoma colorretal a subpopulação de linfócitos predominante nos casos com alta expressão de VKINA é a de linfócitos T CD8.

O potencial imunoestimulador de VKINA no microambiente de tumores humanos parece se conservar também no modelo canino, diante dos nossos achados, principalmente no que se refere ao aumento de linfócitos infiltrantes e circulantes. Linfócitos intratumorais predizem à resposta a quimioterapia e a sobrevida em mulheres com câncer de mama como demonstrado na metanálise que incluiu 23 estudos (13.100 mulheres) feita por WANG e colaboradores (2016). Na espécie canina, a depender de seu imunofenótipo, os linfócitos

também estão associados com fatores prognóstico e sobrevida de cadelas com câncer de mama (ESTRELA-LIMA *et al.*, 2010).

Na contagem diferencial de macrófagos em HE, foi possível perceber um maior número dessas células conforme o aumento do escore de VKINA no grupo de alta expressão. Houve também correlação entre a presença de macrófagos no infiltrado tumoral (contagem diferencial em HE) e alta expressão de VKINA. De acordo com os achados em mieloma descritos por HOPE e colaboradores (2016), VKINA induz células de mieloma CD14⁺ a produzirem IL-1 β e IL-6 e a diferenciação de macrófagos com perfil M2 (fenótipo imunoregulatório II-12^{lo}, II-10^{hi}).

A relação entre a degradação de VCAN e o aumento do número de macrófagos pode ser explicada pelos resultados gerados no estudo supracitado (HOPE *et al.*, 2016), no qual versikina foi capaz de induzir, em um modelo *crosstalk* de células tipo macrófago de mieloma, moléculas que estimulam a ativação de células T incluindo assinaturas transcricionais de interferon tipo I dependentes de IRF8 e a quimiocina CCL2. Ao estimular a quimiocina CCL2, VKINA pode influenciar os mecanismos de recrutamento de monócitos e o papel dos monócitos / macrófagos durante o desenvolvimento de câncer (YOSHIMURA, 2017). Entretanto, não houve correlação entre Versican e a presença de macrófagos em infiltrado tumoral no presente estudo, diferindo dos achados de REIS e colaboradores (2019) que percebeu, tanto em modelo murino quanto em modelo canino de carcinomas mamários, que um alto número de TAMs relacionou-se com a expressão de Versican.

De acordo com Hope e colaboradores (2017), a manipulação terapêutica do eixo VCAN-VKINA por meio de proteólise direcionada de VCAN ou administração da matriquina derivada de VCAN (versikina) pode ser testada clinicamente juntamente com outras modalidades de imunoterapias modernas, sendo uma nova linha de pesquisa também interessante para o câncer de mama de acordo com nossos achados em modelo canino.

Futuros estudos *in vitro* serão cruciais para o melhor entendimento a respeito do potencial imunomodulador de VKINA no câncer de mama. Entretanto, diante da associação entre a proteólise de VCAN e maior presença de linfócitos infiltrantes no microambiente tumoral de carcinomas mamários caninos, acredita-se que VKINA é um interessante candidato à adjuvante em imunoterapias em carcinomas mamários, principalmente visando o recrutamento de linfócitos T CD8 para o microambiente tumoral diante da importância desse tipo celular na resposta à quimioterapia convencional.

7 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos na presente pesquisa foi possível concluir que a expressão de VKINA está relacionada a um pior desfecho no câncer de mama canino, bem como a invasividade de células neoplásicas, maior grau histológico e menor tempo de sobrevida. Neste trabalho também foi demonstrada a relação entre proteólise de VCAN e maior infiltrado de macrófagos e linfócitos intratumorais, assim como com linfócitos circulantes, sugerindo que VKINA pode atuar como matriquina nos carcinomas mamários caninos. Desta forma, acredita-se que o potencial imunomodulador, já descrito em outros tipos tumorais para este proteólito, também pode ser reafirmado em modelo canino de câncer de mama.

Além disso, das enzimas ADAMTS (versicanases) avaliadas, a ADAMTS-9 apresentou relação com tumores de melhor prognóstico, enquanto as ADAMTS-8 e -15 foram associadas ao pior prognóstico, encorajando futuros estudos que explorem o papel destas enzimas no câncer de mama. A análise do eixo VCAN-VKINA e das enzimas proteolíticas envolvidas nele podem trazer importantes resultados para a oncologia comparada a partir de futuros estudos que envolvam a melhor caracterização do microambiente tumoral diante da degradação de VCAN e também a manipulação terapêutica de VKINA a fim de modular o fenótipo das células inflamatórias infiltrantes no microambiente de carcinomas mamários humanos e caninos.

REFERÊNCIAS

ABADIE, Jérôme *et al.* Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, n. 2, p. 459-468, 2018.

ABDELMEGEED, Somaia M. e MOHAMMED, Sulma. Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). **Oncology Letters**, v. 15, n. 6, p. 8195–8205, 2018.

ALBERTSSON, Per A. *et al.* NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 11, p. 603-609, 2003.

ABSI, Tarek S. *et al.* Altered ADAMTS5 Expression and Versican Proteolysis: A Possible Molecular Mechanism in Barlow's Disease. **Annals of Thoracic Surgery**, 2018.

APTE, Suneel S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: Functions and mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 46, p. 31493–31497, 2009.

ARGANO, Martina *et al.* Effects of Two Concentrations of a Clinical Propofol Formulation on Canine Mammary Tumor Cells NET1 Gene Expression: A Preliminary Evaluation of Possible Anti-Metastatic Properties. **Archives on Veterinary Science and Technology**, v. 3, n. 6, 21 Mar 2019.

ASANO, Keiichi *et al.* Stromal versican regulates tumor growth by promoting angiogenesis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

ASIMAKOPOULOS, Fotis *et al.* Versican proteolysis is associated with robust CD8+ T-cell infiltration in human mismatch repair-proficient and -deficient colorectal cancers. **The**

Journal of Immunology, v. 198, n. 1 Supplement, p. 76.28 LP-76.28, 1 Maio 2017.

Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/198/1_Supplement/76.28.abstract>.

BEIRÃO, Breno C.B. *et al.* Canine mammary cancer cells direct macrophages toward an intermediate activation state between M1/M2. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0473-y>>.

BINDER, Marley J. *et al.* The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyalectan proteoglycans and ADAMTS enzymes. **Cancer Letters**, Elsevier Ireland Ltd. , 28 Jan 2017

BLAISDELL, Adam *et al.* Neutrophils oppose uterine epithelial carcinogenesis via debridement of hypoxic tumor cells. **Cancer Cell**, v. 28, n. 6, p. 785-799, 2015.

BORGE, K. S.; BØRRESEN-DALE, A. L.; LINGAAS, F. Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 9, n. 4, p. 241–250, 2011.

BOSMAN, Fred T.; STAMENKOVIC, Ivan. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **Journal of Pathology**. [S.l: s.n.]. , 2003

BRISSON, Becky K. *et al.* Type III collagen directs stromal organization and limits metastasis in a murine model of breast cancer. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 5, p. 1471–1486, 1 Maio 2015.

CARVALHO, Maria Isabel *et al.* A Role for T-Lymphocytes in Human Breast Cancer and in Canine Mammary Tumors. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2 Fev 2014.

CASE, Ashley *et al.* Identification of prognostic collagen signatures and potential therapeutic stromal targets in canine mammary gland carcinoma. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 1 Jul 2017.

CASSALI, Geovanni D. *et al.* Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: Benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 10, n. 3, p. 87–99, 2017.

CHANG, Chao-Chin *et al.* Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 4, p. 391–396, 2009.

CHEN, Dongning *et al.* Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

CHOI, Gigi CG *et al.* The metalloprotease ADAMTS8 displays antitumor properties through antagonizing EGFR–MEK–ERK signaling and is silenced in carcinomas by CpG methylation. **Molecular Cancer Research**, v. 12, n. 2, p. 228–238, 2014.

COFFELT, Seth B.; WELLENSTEIN, Max D.; DE VISSER, Karin E. Neutrophils in cancer: neutral no more. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 7, p. 431, 2016.

COLOTTA, Francesco *et al.* Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009.

CONKLIN, Matthew W.; KEELY, Patricia J. Why the stroma matters in breast cancer: Insights into breast cancer patient outcomes through the examination of stromal biomarkers. **Cell Adhesion and Migration**. [S.l.]: Taylor and Francis Inc. , 2012

CONKLIN, Matthew W. *et al.* Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 3, p. 1221–1232, 2011.

COOLS-LARTIGUE, Jonathan *et al.* Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 8, p. 3446–3458, 2013.

CROSS, N. A. *et al.* The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGF β 1 in prostate cells: Relevance to the accumulation of versican. **Prostate**, v. 63, n. 3, p. 269–275, 2005.

COUSSENS, Lisa M.; POLLARD, Jeffrey W. Leukocytes in mammary development and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 3, p. a003285, 2011.

DAMASCENO, Karine Araújo *et al.* HER-2 and EGFR mRNA expression and its relationship with versican in malignant matrix-producing tumors of the canine mammary gland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 1 Ago 2016.

DE ANDRADE NATAL, Rodrigo *et al.* Exploring collagen parameters in pure special types of invasive breast cancer. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

DE BROT, Simone *et al.* The dog as an animal model for bladder and urethral urothelial carcinoma: Comparative epidemiology and histology. **Oncology Letters**, v. 16, n. 2, p. 1641–1649, 2018.

DE LA FUENTE LÓPEZ, Marjorie *et al.* The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 40, n. 11, p. 1010428318810059, 2018.

DE WIT, Meike *et al.* Lumican and versican are associated with good outcome in stage ii and iii colon cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 20, n. 3 SUPPL., 2013.

DEMING, Dustin A *et al.* Versican proteolysis as a key regulator of CD8+ T-cell infiltration in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 15_suppl, p. e15082–e15082, 20 Maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e15082>.

DENARDO, David G.; COUSSENS, Lisa M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: Crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2007.

DANCEVIC, Carolyn M. *et al.* Biosynthesis and Expression of a Disintegrin-like and Metalloproteinase Domain with Thrombospondin-1 Repeats-15 A NOVEL VERSICAN-CLEAVING PROTEOGLYCANASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 52, p. 37267-37276, 2013.

DENKERT, Carsten *et al.* Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 1, p. 105–113, 2010.

DENKERT, Carsten *et al.* Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. **The Lancet Oncology**, v. 19, n. 1, p. 40–50, 2018.

DESJARDINS, Mark *et al.* Versican regulates metastasis of epithelial ovarian carcinoma cells and spheroids. **Journal of Ovarian Research**, v. 7, n. 1, 26 Jun 2014.

DU, William Weidong *et al.* Versican G3 domain modulates breast cancer cell apoptosis: A mechanism for breast cancer cell response to chemotherapy and egfr therapy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 9 Nov 2011.

DOBSON, J. M. Significant advances in veterinary oncology—60 years on. **Journal of Small Animal Practice**, v. 60, n. 12, p. 711-722, 2019.

DUNN, Julie R. *et al.* Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. **British journal of cancer**, v. 94, n. 8, p. 1186-1193, 2006.

DUSHYANTHEN, Sathana *et al.* Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2015.

EMMERICH, Philip B *et al.* Abstract 3146: Versican proteolysis: A novel immunostimulatory component of CD8+ T cell responses to colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 78, n. 13 Supplement, p. 3146 LP – 3146, 1 Jul 2018. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13_Supplement/3146.abstract>.

ESTRELA-LIMA, Alessandra *et al.* Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

FANHCHAKSAI, Kanda *et al.* Host stromal versican is essential for cancer-associated fibroblast function to inhibit cancer growth. **International journal of cancer**, v. 138, n. 3, p. 630-641, 2016.

FAZEKAS, Judit *et al.* Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine (Review). **Oncology Letters**, v. 12, n. 4, p. 2271–2276, 2016.

FERREIRA, Enio *et al.* Columnar cell lesions of the canine mammary gland: pathological features and immunophenotypic analysis. **Bmc Cancer**, v. 10, n. 1, p. 61, 2010.

GOEBEL, Katie; MERNER, Nancy D. A monograph proposing the use of canine mammary tumours as a model for the study of hereditary breast cancer susceptibility genes in humans. **Veterinary Medicine and Science**, v. 3, n. 2, p. 51–62, 2017.

GRÜNTZIG, K. *et al.* Swiss Canine Cancer Registry 1955–2008: Occurrence of the Most Common Tumour Diagnoses and Influence of Age, Breed, Body Size, Sex and Neutering Status on Tumour Development. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 2–3, p. 156–170, 2016.

GUPTA, Nidhi; KUMAR, Raman e SHARMA, Alpana. Versikine, a proteolysis product of Versican: novel therapeutics for multiple myeloma. **Translational Cancer Research**, v. 5, n. S7, p. S1437–S1439, 2017.

GYORKI, David E. *et al.* Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2009.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>.

HARAGUCHI, Naotsugu *et al.* High expression of ADAMTS5 is a potent marker for lymphatic invasion and lymph node metastasis in colorectal cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 6, n. 1, p. 130-134, 2017.

HARTLEY, G. *et al.* Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 2, p. 534–549, 2017.

HINRICHS e AL. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. . [S.l: s.n.], 1999.

HOPE, Chelsea *et al.* Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. **Blood**, 2016a.

HOPE, Chelsea *et al.* Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. **Blood**, v. 128, n. 5, p. 680–685, 2016b.

HOPE, Chelsea *et al.* TPL2 kinase regulates the inflammatory milieu of the myeloma niche. **Blood**, v. 123, n. 21, p. 3305–3315, 2014.

HOPE, Chelsea *et al.* Versican-Derived Matrikines Regulate Batf3–Dendritic Cell Differentiation and Promote T Cell Infiltration in Colorectal Cancer. **The Journal of Immunology**, 2017.

IM, Keum Soon *et al.* Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. **Veterinary Journal**, v. 195, n. 3, p. 366–372, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.014>>.

ITOH, Teruo *et al.* Clinicopathological Survey of 101 Canine Mammary Gland Tumors: Differences between Small-Breed Dogs and Others. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 3, p. 345–347, 4 Abr 2005.

JEFFREY, Wyckoff *et al.* A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. **Cancer Research**, v. 64, n. 19, p. 7022–7029, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1449>>.

KERN, Christine B. *et al.* Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. **Matrix biology**, v. 29, n. 4, p. 304-316, 2010.

KIM, J. H. *et al.* Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2-3, p. 177-186, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.023>>.

KLATT, Andreas R. *et al.* A critical role for collagen II in cartilage matrix degradation: Collagen II induces pro-inflammatory cytokines and MMPS in primary human chondrocytes. **Journal of Orthopaedic Research**, 2009.

KRISTENSEN, Vessela N. *et al.* Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma in situ (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. 2802-2807, 2012.

LIM, H. Y. *et al.* Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 6, p. 1045-1051, 1 Nov 2015.

LIM, H. Y. *et al.* Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 3, p. 326-331, 1 Mar 2015.

LINDE, Nina *et al.* Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02481-5>>.

LOI, Sherene *et al.* RAS/MAPK activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: Therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. **Clinical Cancer Research**, 2016.

LAKSHMI, Harish Neelamraju *et al.* A Case of Carcinosarcoma of the Breast Presenting as Inflammatory Carcinoma and Review of the Literature. **Cureus**, v. 12, n. 8, 2020.

LATTOUF, Raed *et al.* Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751-758, 2014.

MAEKAWA, Naoya *et al.* Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–13, 2016.

MALVIA, Shreshtha *et al.* Study of Gene expression profiles of breast cancers in Indian women. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

MAO, H. *et al.* The use of Masson's trichrome staining, second harmonic imaging and two-photon excited fluorescence of collagen in distinguishing intestinal tuberculosis from Crohn's disease. **Colorectal Disease**, v. 18, n. 12, p. 1172-1178, 2016.

MCCULLOCH, Daniel R. *et al.* ADAMTS metalloproteases generate active versican fragments that regulate interdigital web regression. **Developmental cell**, v. 17, n. 5, p. 687-698, 2009.

MAHMOUD, Sahar M.A. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. 1949–1955, 2011.

MALLER, O. *et al.* Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 18, p. 4108–4110, 15 Set 2013.

MANDAL, Rajarsi *et al.* The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. **JCI insight**, v. 1, n. 17, 2016.

MANLEY, P. N.; ANCSIN, J. B.; KISILEVSKY, R. Rapid recycling of cholesterol: the joint biologic role of C-reactive protein and serum amyloid A. **Medical hypotheses**, v. 66, n. 4, p. 784-792, 2006.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, 2013.

MARTÍNEZ-LOSTAO, Luis; ANEL, Alberto; PARDO, Julián. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 22, p. 5047–5056, 2015.

MCCULLOCH, Daniel R. *et al.* ADAMTS Metalloproteases Generate Active Versican Fragments that Regulate Interdigital Web Regression. **Developmental Cell**, v. 17, n. 5, p. 687–698, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.008>>.

MELIN, Malin *et al.* Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 5, 1 Maio 2016.

MOHR, Annika *et al.* Hormone receptor expression analyses in neoplastic and non-neoplastic canine mammary tissue by a bead based multiplex branched DNA assay: A gene expression study in fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2016.

MONTEIRO, L. N. *et al.* Tumour-associated macrophages: Relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary Journal**, v. 234, n. 2010, p. 119–125, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.02.016>>.

MUKARATIRWA, S. *et al.* Versican and hyaluronan expression in canine colonic adenomas and carcinomas: Relation to malignancy and depth of tumour invasion. **Journal of Comparative Pathology**, v. 131, n. 4, p. 259–270, 2004.

MUNDAY, John *et al.* Immunostaining for p53 and p16CDKN2A Protein Is Not Predictive of Prognosis for Dogs with Malignant Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Sciences**, v. 6, n. 1, p. 34, 2019.

NAJAFI, Masoud; FARHOOD, Bagher; MORTEZAEI, Keywan. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 2782-2790, 2019.

NAHOMI, Tokudome *et al.* A case of carcinosarcoma of the breast. **Breast Cancer**, v. 12, n. 2, p. 149-153, 2005.

NANDADASA, Sumeda e FOULCER, Simon e APTE, Suneel S. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. **Matrix Biology**, v. 35, p. 34–41, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.005>>.

NICCHIO, Bianca Oliveira *et al.* Hyperresistinemia in obese female dogs with mammary carcinoma in benign-mixed tumors and its correlation with tumor aggressiveness and survival. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, 2020.

NIETO, A. *et al.* BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: Relationship with prognostic variables. **Journal of Comparative Pathology**, v. 128, n. 4, p. 260–268, 2003.

NUNES, Fernanda Camargo *et al.* Analysis of clinico-pathological data, therapeutical conduct and overall survival of canine mammary lesions attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). **Braz. J. Vet. Pathol.**, p. 122-126, 2014.

NUNES, F. C. *et al.* Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 2018.

NUNES, Fernanda Camargo *et al.* Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, 1 Jun 2019.

OSTUNI, Renato e colab. Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 4, p. 229–239, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.02.004>>.

OWEN LN. Classification of Tumours in Domestic Animals Ed I **Ted.** 1980.

PAGÈS, Franck *et al.* Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 25, p. 2654–2666, 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051424>>.

PASTOR, Nieves *et al.* Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. **Austral journal of veterinary sciences**, v. 50, n. 3, p. 143-147, 2018.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO reports**, v. 15, n. 12, p. 1243–1253, 2014.

PIERCE, Brandon L. *et al.* Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 21, p. 3437, 2009.

PINHO, Salomé S. *et al.* Canine tumors: A spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**. [S.l.]: Mosby Inc. , 2012

POLLARD, Jeffrey W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, 2009.

PAGENKOPF, Adam *et al.* Versican (VCAN) proteolysis predicts T-cell infiltration in myeloma bone marrow post-autologous stem cell transplant (ASCT). **Blood**, v. 130, n. Supplement 1, p. 1756-1756, 2017.

PAPADAS, Athanasios *et al.* Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, p. 0022155420937098, 2020.

PORTER, Sarah *et al.* ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma. **International journal of cancer**, v. 118, n. 5, p. 1241-1247, 2006.

PORTER, Sarah *et al.* Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 7, p. 2429-2440, 2004.

RAPOSO, T *et al.* Prognostic value of tumour-associated macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 12, n. 1, p. 10–9, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533625>>.

RASOTTO, Roberta *et al.* Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 4, p. 571–578, 1 Jul 2017.

RITTIÉ, Laure. Method for picrosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. In: **Fibrosis**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 395-407.

RIVERA, Patricio J. *et al.* Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8770–8774, 2009.

RUSSELL, John H.; LEY, Timothy J. Lymphocyte mediated cytotoxicity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 323–370, 2002. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730>>.

SALAS, Yaritza *et al.* Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 18 Maio 2015.

SANTOS, Thaisa R. *et al.* Risk factors associated with mammary tumors in female dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 466-473, 2020.

SEMERARO, Michaela *et al.* Natural killer cell mediated immunosurveillance of pediatric neuroblastoma. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 11, p. e1042202, 2015.

SERRA, Montserrat *et al.* V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential. **International journal of cancer**, v. 114, n. 6, p. 879-886, 2005.

- SETOGUCHI, Tomohiko *et al.* Microarray analysis identifies versican and CD9 as potent prognostic markers in gastric gastrointestinal stromal tumors. **Cancer science**, v. 102, n. 4, p. 883-889, 2011.
- SJÖDAHL, Gottfrid *et al.* Infiltration of CD3+ and CD68+ cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. **Elsevier**, 2014. p. 791-797.
- SHIN, J. I. *et al.* Analysis of Obesity-Related Factors and their Association with Aromatase Expression in Canine Malignant Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 1, p. 15–23, 2016.
- SILVER, Susan A.; TAVASSOLI, Fattaneh A. Mammary ductal carcinoma in situ with microinvasion. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 82, n. 12, p. 2382-2390, 1998.
- SIMPSON, Siobhan *et al.* Comparative review of human and canine osteosarcoma: morphology, epidemiology, prognosis, treatment and genetics. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 59, n. 1, p. 71, 2017.
- SLEECKX, N. *et al.* Canine mammary tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112–1131, 2011.
- SMITH, David C *et al.* **new england journal**. p. 2443–2454, 2012.
- SORENMO, K. U. *et al.* Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 85–97, 2011.
- SOUSA, Sofia *et al.* Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13058-015-0621-0>>.

SPICER, Jonathan D. *et al.* Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1–mediated interactions with circulating tumor cells. **Cancer research**, v. 72, n. 16, p. 3919-3927, 2012.

SPOERRI, Michèle *et al.* Endocrine control of canine mammary neoplasms: Serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>>.

STANTON, Heather *et al.* Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1812, n. 12, p. 1616–1629, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.08.009>>.

STUPKA, Nicole *et al.* Versican processing by a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats proteinases-5 and-15 facilitates myoblast fusion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 3, p. 1907–1917, 2013.

SUWIWAT, Supaporn *et al.* Expression of Extracellular Matrix Components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin, and Hyaluronan, and Their Association with Disease Outcome in Node-Negative Breast Cancer. . [S.l: s.n.], 2004.

SVERDRUP BERGE, Kaja *et al.* The ESR1 gene is associated with risk for canine mammary tumours. . [S.l: s.n.], 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/69>>.

TANG, Xiaoqiang. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. **Cancer Letters**. [S.l: s.n.]. , 2013

TAZAWA, Hiroshi *et al.* Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. **The American journal of pathology**, v. 163, n. 6, p. 2221-2232, 2003.

TEIXEIRA, S. V. *et al.* Serum evaluation of leptin, IL-6, IGF-1 and estrogen in obese bitches with early stages of mammary carcinoma. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 1, p. 143–150, 2019.

THEOCHARIS, Achilleas D. Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1588, n. 2, p. 165–172, 20 Nov 2002.

TORÍBIO, Julia Morena de Miranda Leão *et al.* Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 427–433, 2012.

TOKUDOME, N. *et al.* A case of carcinosarcoma of the breast. **Breast cancer**, v. 12, p. 149–53, 2015.

VASCELLARI, Marta *et al.* Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. **BMC Veterinary Research**, v. 5, p. 1–9, 2009.

VIEIRA-FILHO, Carlos H.C. *et al.* Tumor-associated macrophage is correlated with survival and SOCS protein expression in canine mammary carcinoma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2018.

VOUTILAINEN, Kirsi *et al.* Versican in epithelial ovarian cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors and prognosis. **International journal of cancer**, v. 107, n. 3, p. 359–364, 2003.

WALKER, Cameron; MOJARES, Elijah; DEL RÍO HERNÁNDEZ, Armando. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 2018.

WANG, Ke *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 44288, 2016.

WATSON, Joshua L.; FENG, Yuan; ZHAO, Shaying. Multiomic validation of canine simple carcinoma as a model for human basal-like breast cancer. 2019.

WIGHT, Thomas N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. **Current opinion in cell biology**, v. 14, n. 5, p. 617–23, 2002a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231358>>.

WEIGELT, Britta; PETERSE, Johannes L.; VAN'T VEER, Laura J. **Breast cancer metastasis: markers and models**. *Nature reviews cancer*, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005.

YEE, Albert J.M. *et al.* The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, 27 Jul 2007.

ZHANG, Lin *et al.* Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 3, p. 203–213, 2003. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa020177>>.

ZIMMERMANN, D.R.; RUOSLAHTI, E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 10, p. 2975–2981, Out 1989.

APÊNDICE

Apêndice A

VCAN e Parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros	Estroma		P Valor
	Baixa Expressão N (%)	Alta Expressão N (%)	
Clinico-patológicos			
Tipo Histológico			
CTM	14/23 (60,86)	13/19(68,42)	
CSS	9 /23(39,13)	6 /19(31,57)	-
Metástase à distância			
Sim	0/23 (0)	2 /19(10,52)	
Não	23/23 (100)	17/19 (89,47)	-
Metástase em linfonodo			
Sim	2/23 (8,6)	2/19(10,52)	
Não	21/23(91,30)	17/19(89,47)	-
Tamanho			
T1 (< 3 cm)	0/23 (0)	0 /19(0)	
T2 (3<x<5 cm)	5/23 (21,73)	9 /19(47,36)	0,2292
T3 (≥ 5cm)	16 /23(69,56)	8 /19(42,10)	
Estadiamento clínico			
I	0/23 (0)	0/19 (0)	
II	8/23 (34,78)	11/19 (57,89)	
III	13/23 (56,52)	5/19 (26,31)	-
IV	2/23 (8,6)	2/19(10,52)	
V	0/23 (0)	2 /19(10,52)	
Grau histológico			
I	8/23 (34,78)	8/19 (42,10)	
II	7/23 (30,43)	7/19 (36,84)	0,0403
III	6/23 (26,08)	3/19 (15,78)	
IPN			
Bom Prognóstico (<3.4)	12/23 (52,17)	12/19 (63,15)	
Moderado (3.41 – 5.4)	10/23(43,47)	7/19 (36.84)	0,2105
Ruim (>5.41)	1/23 (4,34)	0/19 (0)	

Apêndice B

Vkin e Parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros	Estroma		P Valor
	Baixa Expressão (%)	N Alta Expressão N (%)	
Clinico-patológicos			
Tipo Histológico			
CTM	17/24 (70,83)	12/21 (57,1)	
CSS	7 /24 (29,16)	9/21 (42,85)	-
Metástase à distância			
Sim	0/24 (0)	1/21 (4,46)	-
Não	24/24 (100)	2//21(9,52)	
Metástase em linfonodo			
Sim	0/24 (0)	4/21 (19,4)	-
Não	24/24 (100)	17/21 (80,95)	
Tamanho			
T1 (< 3 cm)	0/24 (0)	0 /21 (0)	
T2 (3<x<5 cm)	12/24 (50)	6/21 (28,57)	0,2452
T3 (≥ 5cm)	12/24 (50)	15/21 (71,42)	
Estadiamento clínico			
I	0/24 (0)	0/21 (0)	
II	10/24 (41,66)	8/21 (38,09)	
III	13/24 (54,16)	9/21 (42,85)	-
IV	1 /24 (4,1)	3/21 (14,28)	
V	0/24 (0)	1/21 (4,76)	
Grau histológico			
I	13/24 (54,16)	8/21 (38,09)	
II	9/24 (37,5)	6 /21 (28,57)	0,0692
III	2/24 (8,3)	7/21 (33,33)	
IPN			
Bom Prognóstico (<3.4)	16/24 (66,66)	11/21 (52,3)	
Moderado (3.41 – 5.4)	8/24 (33,33)	8/21 (38,09)	0.0449
Ruim (>5.41)	0 /24 (0)	1/21 (4,7)	

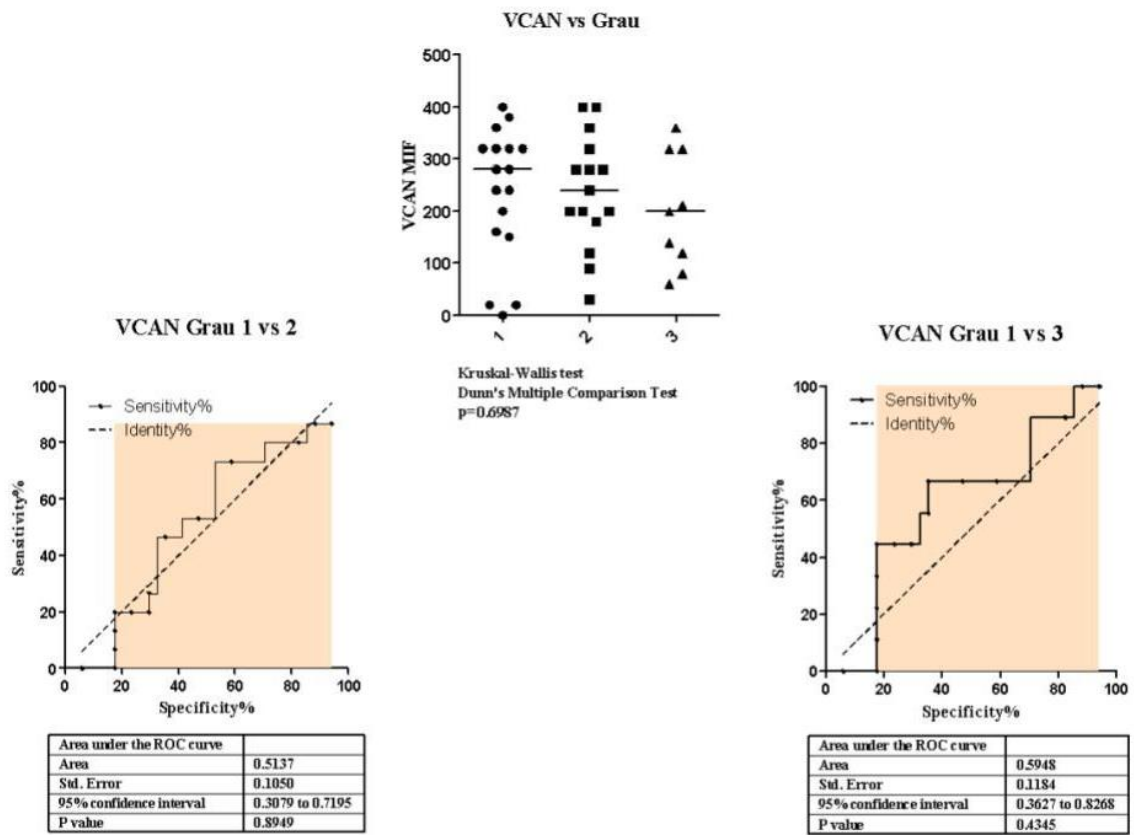
Apêndice C

Mediana dos scores de expressão de VCAN e VKINA conforme tipo histológico

	VCAN		VKINA	
	CTM (n/total)	CSS (n/total)	CTM (n/total)	CSS (n/total)
Baixa expressão (Score)	160 (14/30)	130 (9/17)	120 (17/30)	90 (7/17)
Alta expressão (Score)	210 (13/30)	275 (6/17)	210 (12/30)	227 (9/17)
Não avaliados (n)	3/30	2/17	1/30	1/17

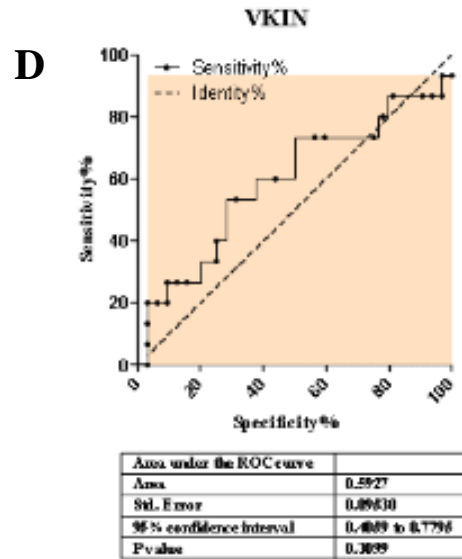
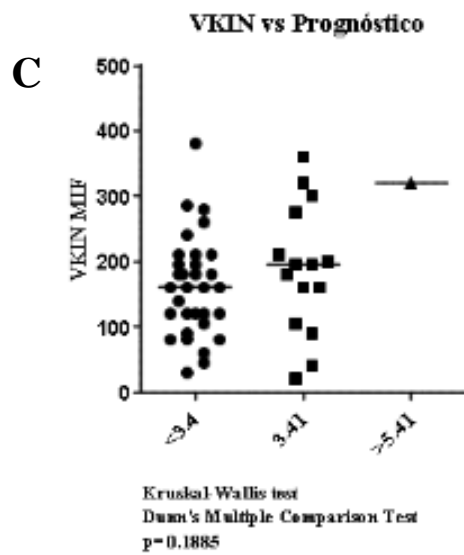
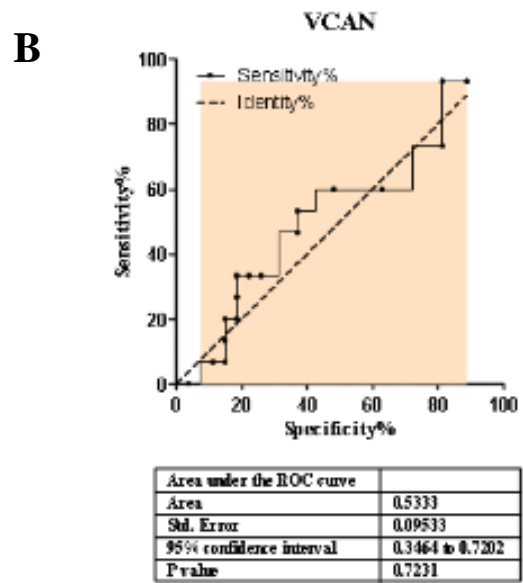
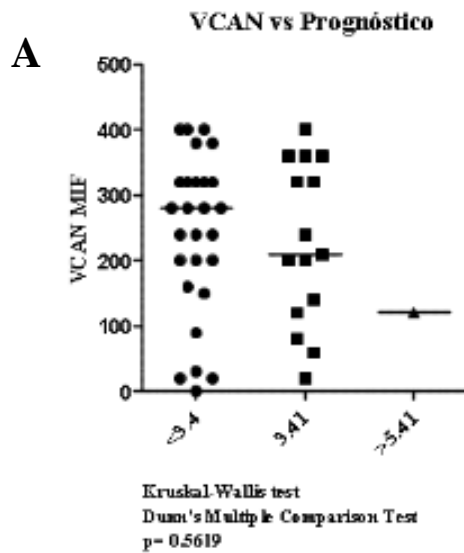
Apêndice D

Curva ROC da Análise de VCAN de acordo com o grau histológico



Apêndice E

Curva ROC da Análise de VCAN e VKINA de acordo com o IPN



Apêndice F

Mediana dos scores de expressão das enzimas ADAMTS em áreas *in situ* e de invasão

	Epitélio		Estroma		Não avaliados n / total
	IS	IV	IS	IV	
	Mediana (n/total)	Mediana (n/total)	Mediana (n/total)	Mediana (n/total)	
ADAMTS-1	0 (41/47)	0 (41/47)	0 (41/47)	0 (41/47)	06/47
ADAMTS-5	145 (31/47)	140 (31/47)	0 (31/47)	0 (31/47)	16/47
ADAMTS-8	60 (31/47)	0 (31/47)	70 (31/47)	0 (31/47)	16/47
ADAMTS-9	40 (32/47)	0 (32/47)	50 (32/47)	0 (32/47)	07/47
ADAMTS-15	120 (42/47)	10 (42/47)	120 (42/47)	20 (42/47)	05/47

ANEXOS

ANEXO 1- Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas

Lesões epiteliais não-neoplásicas

Hiperplasias epiteliais

Hiperplasias ductais

Hiperplasias lobulares

Adenose

Lesões de células colunares

Alteração de células colunares

Hiperplasia de células colunares

Lesões de células colunares atípicas

Tumores benignos

Adenoma

Adenoma complexo ou adenomioepitelioma

Adenoma basalóide

Fibroadenoma

Tumor misto benigno

Papiloma ductal

Tumores Malignos

Carcinomas

Carcinomas in situ

Carcinoma ductal in situ

Carcinoma lobular in situ

Carcinoma em tumor misto

Carcinoma complexo ou adenomioepitelioma maligno

Carcinoma papilar

Carcinoma tubular

Carcinoma sólido

Carcinomas tipos especiais

Carcinoma micropapilar

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma lobular pleomórfico

Carcinoma secretor

Carcinoma mucinoso

Carcinoma rico em lípidos

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma anaplásico

Neoplasia mamária com diferenciação sebácea

Sarcomas

Fibrossarcoma

Osteossarcoma

Carcinossarcoma

Sarcoma em tumor misto

Outros sarcomas

Condrossarcoma puro

Lipossarcoma

Hemangiossarcoma

Fonte: CASSALI *et al.*,2014

ANEXO 2 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela

Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)
T0 Tumor não detectável	N0 Sem evidência de linfonodo regional (axilares ou inguinais)
T1 Tumor < 3 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N1 Linfonodo Ipsilateral envolvido a : não fixo b : fixo
T2 Tumor de 3 – 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao Músculo	N2 Linfonodos bilaterais envolvidos a : não fixo b : fixo
T3 Tumor > 5 cm a : não fixo b : fixo à Pele c : fixo ao músculo	Metástases à Distância (M) M0 Sem evidência de metástase distante M1 Metástase distante incluindo linfonodos não-regionais
T4 Tumor de qualquer tamanho (Carcinoma inflamatório)	

Agrupamento por estádios

Estadiamento	T	N	M
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
Estadio IV	T1;T2;T3	N1	M0
Estádio V	T1;T2;T3	N0;N1	M1

T- tamanho do tumor primário; N- Linfonodo; M- Metástase (Fonte: CAVALCANTI e CASSALI, 2006, modificado de OWEN, 1980).

ANEXO 3 - Classificação histológica das neoplasias mamárias caninas

Lesões epiteliais não-neoplásicas**Hiperplasias epiteliais**

Hiperplasias ductais

Hiperplasias lobulares

Adenose

Lesões de células colunares

Alteração de células colunares

Hiperplasia de células colunares

Lesões de células colunares atípicas

Tumores benignos

Adenoma

Adenoma complexo ou adenomioepitelioma

Adenoma basalóide

Fibroadenoma

Tumor misto benigno

Papiloma ductal

Tumores Malignos**Carcinomas**

Carcinomas in situ

Carcinoma ductal in situ

Carcinoma lobular in situ

Carcinoma em tumor misto

Carcinoma complexo ou adenomioepitelioma maligno

Carcinoma papilar

Carcinoma tubular

Carcinoma sólido

Carcinomas tipos especiais

Carcinoma micropapilar

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma lobular pleomórfico

Carcinoma secretor

Carcinoma mucinoso

Carcinoma rico em lipídios

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma anaplásico

Neoplasia mamária com diferenciação sebácea

Sarcomas

Fibrossarcoma

Osteossarcoma

Carcinossarcoma

Sarcoma em tumor misto

Outros sarcomas

Condrossarcoma puro

Lipossarcoma

Hemangiossarcoma

Fonte: CASSALI *et al.*,2014

ANEXO 4 - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.

Características	Pontuação
Formação tubular	
75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
<10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear semelhante á célula normal (2 a 3 x o tamanho da hemácia)	1
Moderado aumento e variabilidade	2
Grande variação	3
Índice mitótico	
0 a 8 mitoses	1
9 a 16 mitoses	2
17 ou mais mitoses	3

Alocação do grau tumoral

<u>Total de escore</u>	<u>Grau de malignidade</u>
3-5	I
6-7	II
8-9	III

(FONTE: CASSALI *et al.*, 2011a, modificado de ELSTON e ELLIS, 1998)

ANEXO 5 – Certificado de aprovação CEUA-CPqGM

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 007/2018

PROJETO: "Papel da proteólise de versican na imunomodulação de macrófagos em microambiente tumoral"

COORDENADORA: Dra. Karine Araújo Damasceno

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Cães	50

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.794/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 06/09/2018, e tem validade até 06/09/2020.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 09/08/2018, being valid until 09/08/2020.


SOLICITAMOS O ENVIO DOS RELATÓRIOS PARCIAL E FINAL NOS PRAZOS ESTABELECIDOS ABAIXO:

Vigência: 06/09/2018 a 06/09/2020.

Relatório parcial: 07/09/2019

Relatório Final: 07/09/2020.

Salvador, 06 de setembro de 2018.


LEONARDO PAIVA FARIAS
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Dr. Leonardo Paiva Farias
 Pesquisador em Saúde Pública
 SIAPE 2181864