

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**RELAÇÃO ENTRE AS VERSICANASES ADAMTS E MICROAMBIENTE
INFLAMATÓRIO NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES: ESTUDO EM
MODELO DE CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1**

JÚLIA SOUZA SOLEDADE SANTOS

Salvador - Bahia

2023

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**RELAÇÃO ENTRE AS VERSICANASES ADAMTS E MICROAMBIENTE
INFLAMATÓRIO NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES: ESTUDO EM
MODELO DE CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1**

JÚLIA SOUZA SOLEDADE SANTOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Karine Damasceno

Coorientadores: Prof. Dr. Diego dos Reis; Prof. Dr. Thiago Marconi

Salvador - Bahia

2023

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

S237r Santos, Júlia Souza Soledade

Relação entre as versicanases ADAMTS e microambiente inflamatório no desenvolvimento de metástases: estudo em modelo de carcinoma mamário triplo negativo 4T1 / Júlia Souza Soledade Santos. _ Salvador, 2023.

85 f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Karine Damasceno

Coorientadores: Prof. Dr. Diego dos Reis; Prof. Dr. Thiago Marconi

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Câncer de mama triplo negativo. 2. Degradação. 3. Matriz extracelular.
4. Versicanases. I. Título.

CDU 618.19-006


“RELAÇÃO ENTRE AS VERSICANASES ADAMTS E MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES: ESTUDO EM MODELO DE CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1”

JÚLIA SOUZA SOLEDADE SANTOS


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 01 de setembro de 2023


COMISSÃO EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ENIO FERREIRA
Data: 05/09/2023 23:12:37-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Enio Ferreira
Professor Associado
UFMG

Documento assinado digitalmente
 EUGENIA TERRA GRANADO PINA
Data: 05/09/2023 18:59:21-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Eugênia Terra Granado Pina
Tecnologista em Saúde Pública
IGM/Fiocruz

Documento assinado digitalmente
 DANIEL PEREIRA BEZERRA
Data: 01/09/2023 16:19:04-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador em Saúde Pública
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, especialmente aos meus pais Célia e Paulo por me encherem de sabedoria, educação, empatia e por serem o meu porto seguro durante essa caminhada árdua. Obrigada por todo amor e apoio incondicional, sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço aos meus amigos que sempre conseguiram tirar um sorriso do meu rosto nos meus dias mais conturbados e tristes. Além de sempre estarem comigo nas minhas conquistas vibrando comigo e por mim. Um especial obrigado para Joana, Victor, Mariana e Gabriela por estarem comigo todos os dias conversando e me motivando.

À minha orientadora Karine pela paciência em sempre me ensinar e explicar tudo nos mínimos detalhes. Por sempre me ajudar durante esses dois anos e por oferecer uma orientação excepcional frente a esse trabalho. Por acreditar em mim e no meu potencial.

Agradeço aos meus coorientadores Thiago e Diego que sempre disponibilizavam o seu tempo e passavam todo seu conhecimento para mim com calma e com todo o prazer. Muito obrigada por esse apoio, foi essencial para mim.

Gratidão aos professores das disciplinas que cursei no PGBSMI que me ajudaram a crescer durante esse período como pessoa e como profissional, por todos os ensinamentos, paciência e por nos mostrar a sua admiração pela pesquisa.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer ao GOC, o qual me trouxe amizades incríveis, aquele que me ensinou a ter comprometimento, responsabilidade, confiança, segurança e que me proporcionou vivenciar experiências incríveis e únicas. Obrigada Ana, Bruno, Simone, Lorena, Duda, Laiane, Esther, Stephanie e Ágatha. Imensa gratidão a todos vocês.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Muito obrigada!

É graça divina começar bem. Graça Maior persistir na caminhada certa. Mas graça das graças é não desistir nunca.

(Dom Hélder Câmara)

SANTOS, Júlia Souza Soledade. **Relação entre as versicanases ADAMTS e microambiente inflamatório no desenvolvimento de metástases**: estudo em modelo de carcinoma mamário triplo negativo 4T1. 2023. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

RESUMO

O câncer de mama triplo negativo é conhecido como o subtipo molecular de pior prognóstico quando comparado aos demais. Estudos atuais demonstram que a matriz extracelular (MEC) é um fator importante para o caráter agressivo de alguns tipos de câncer. Dentre os elementos da MEC, os proteoglicanos são essenciais para a manutenção da estrutura do tecido, como por exemplo o versican (VCAN). Esse proteoglicano, quando fragmentando, gera proteólitos que têm sido relacionados à atividade de matriquinas, uma vez que apresentam função imunomoduladora associada à progressão tumoral e a angiogênese. Todavia, a relação de matriquinas com o remodelamento da matriz ainda não foi elucidada. Objetiva-se avaliar a relação entre as versicanases, microambiente tumoral inflamatório e desenvolvimento de metástases em modelo murino 4T1. Foram realizadas análises histomorfológicas em amostras de tumor primário, linfonodo regional e pulmão nos grupos de 7, 14, 21 e 28 dias de crescimento tumoral e análises da expressão imuno-histoquímica de VCAN, VKINA, as desintegrinas e metaloproteínases com domínios trombospondinas (ADAMTS) -1, -5 e -15, bem como análise do perfil imunofenotípico de células da resposta imune em sangue periférico e infiltrado tumoral. Ao longo dos 28 dias, houve um aumento crescente da expressão de VCAN. Contudo, a expressão de VKINA atingiu maior mediana aos 21 dias de crescimento tumoral, assim como a ADAMTS15. ADAMTS1 e 5 foram mais expressas em estroma aos 21 e 28 dias de inoculação tumoral. VCAN, ADAMTS 1 e 5 apresentaram maior expressão nas últimas semanas do experimento, com correlação direta ao perfil predominantemente pró-inflamatório. No entanto, VKINA e ADAMTS15 apresentaram maior expressão na terceira semana, quando há o surgimento de metástases nesse modelo. Além da alta expressão de VKINA em 21 dias, esse proteólito teve relação com perfil imune predominantemente anti-inflamatório, criando um microambiente favorável a progressão do tumor. Os resultados sugerem uma relação entre degradação da MEC e perfil inflamatório. Contudo, ainda se faz necessário compreender os efeitos destes perfis imunes no remodelamento da matriz extracelular com relação das versicanases e seu proteólito nos diferentes tempos de progressão tumoral.

Palavras-chave: Câncer de mama triplo negativo. Degradação. Matriz extracelular. Versicanases.

SANTOS, Júlia Souza Soledade. **Relationship between ADAMTS versicanases and inflammatory microenvironment in the development of metastases: study in a 4T1 triple negative breast carcinoma model.** 2023. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

ABSTRACT

Triple negative breast cancer is known as the molecular subtype with the worst prognosis when compared to the others. Current studies demonstrate that the extracellular matrix (ECM) is an important factor in the aggressive nature of some types of cancer. Among the elements of the ECM, proteoglycans are essential for the maintenance of tissue structure, such as versican (VCAN). This proteoglycan, when fragmented, generates proteolytes that have been related to the activity of matrikins, since they have an immunomodulatory function associated with tumor progression and angiogenesis. However, the relationship between matrikins and matrix remodeling has not yet been elucidated. The objective is to evaluate the relationship between versicanases, inflammatory tumor microenvironment and the development of metastases in a 4T1 murine model. Histomorphological analyzes were performed on primary tumor, regional lymph node and lung samples in the groups of 7, 14, 21 and 28 days of tumor growth and analyzes of the immunohistochemical expression of VCAN, VKINA, disintegrins and metalloproteinases with thrombospondin domains (ADAMTS) - 1, -5 and -15, as well as analysis of the immunophenotypic profile of immune response cells in peripheral blood and tumor infiltrate. Over the 28 days, there was an increasing increase in VCAN expression. However, VKINA expression reached a higher median at 21 days of tumor growth, as did ADAMTS15. ADAMTS1 and 5 were more expressed in stroma at 21 and 28 days of tumor inoculation. VCAN, ADAMTS 1 and 5 showed greater expression in the last weeks of the experiment, with a direct correlation to the predominantly pro-inflammatory profile. However, VKINA and ADAMTS15 showed greater expression in the third week, when metastases appear in this model. In addition to the high expression of VKINA in 21 days, this proteolyte was related to a predominantly anti-inflammatory immune profile, creating a microenvironment favorable to tumor progression. The results suggest a relationship between the degradation of the extracellular matrix (ECM) and the inflammatory profile. However, it is still necessary to understand the effects of these immune profiles on the remodeling of the extracellular matrix, particularly concerning versicanases and their proteolysis at different stages of tumor progression.

Keywords: Triple negative breast cancer. Degradation. Extracellular matrix. Versicanases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática de isoformas e domínios versican de humanos	27
Figura 2	Organização do domínio básico dos 19 membros da família ADAMTS e seus principais grupos funcionais	29
Figura 3	Peso dos camundongos no período de 28 dias de experimento	42
Figura 4	Volume do tumor no período de 28 dias do experimento	43
Figura 5	Peso dos tumores no período de 28 dias.	44
Figura 6	Fotomicrografia de tumor no grupo de 28 dias na coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)	44
Figura 7	Parênquima pulmonar sem e com foco de metástase nos grupos de 14, 21 e 28 dias	46
Figura 8	Coloração em Tricrômico de Masson revelando deposição de colágeno no estroma peritumoral (a) e nas células tumorais (b) no aumento de 40x	47
Figura 9	Expressão de VCAN no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias.	48
Figura 10	Expressão de VKINA no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias.	49
Figura 11	Expressão de ADAMTS1 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias.	50
Figura 12	Expressão de ADAMTS5 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias.	51
Figura 13	Expressão de ADAMTS15 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias.	52
Figura 14	Fotomicrografias das expressões de VCAN, VKINA e as enzimas ADAMTS1,5 E 15 em tecido tumoral murino.	53

Figura 15	Expressão de VCAN, VKINA, ADAMTS1, ADAMTS5 ADAMTS15 no tecido pulmonar no período de 28 dias.	54
Figura 16	Gráficos de regressão linear da correlação de VCAN com a coloração PS e TM	55
Figura 17	Gráficos de regressão linear da correlação com as ADAMTS5 e 15 com a coloração de PS e TM.	56
Figura 18	Fotomicrografias de pulmão expressando VCAN	57
Figura 19	Endereçamento de ICAM+ e VCAM+ na resposta imunológica	58
Figura 20	Número de células CD11b + no infiltrado tumoral de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias.	59
Figura 21	Caracterização do perfil de linfócitos no sangue periférico.	60
Figura 22	Caracterização do perfil de células mielóides no tumor.	62
Figura 23	Caracterização dos perfis de linfócitos no sangue periférico das moléculas IL-10 (a), TNF (b),FOXP3 (c), CD62L (d), CD54 (e), PERF (f) e IFN (g).	62
Figura 24	Caracterização dos perfis das células mielóides no tumor das moléculas IL-2, CD16/32 (a),Arginase, IL-12 (b) e MHC II (c).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Respectivas recuperações antigênicas e diluições dos anticorpos que são utilizados no experimento 4T1 no modelo murino	38
Tabela 2	Respectivos anticorpos utilizados para o painel de citometria de linfócitos, macrófagos/monócitos, moléculas de adesão e células NK	39
Tabela 3	Avaliação de presença de necrose, ulceração e metástase nos camundongos aos 7, 14, 21 e 28 dias de acompanhamento.	40
Tabela 4	Caracterização das fibras de colágeno na coloração de TM e PS	45
Tabela 5	Caracterização das fibras de colágeno na coloração de TM e PS.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs; desintegrinase metaloproteinases com domínios trombospondinas
BRCA	Breast Cancer gene
CAP	Célula apresentadora de antígeno
CD14	Cluster of Differentiation 44; Grupamento de diferenciação 44
CD16	Células NK
CMTN	Câncer de mama triplo-negativo
DAMP	Damage associated molecular patterns
ER	Estrogenio
FOXP3	Forkhead box P3
GAG	Glicosaminoglicano
HER-2	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2; receptor do fator de crescimento epidermal-tipo 2
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INCA	Instituto nacional de câncer
MEC	Matriz extra celular
MHC II	Major histocompatibility complex class II
MMP	Metaloproteinases de matriz
NK	Natural Killer
RE	Receptor de progesterona
RP	Receptor de estrógeno
PERF	Perforina
PR	Progesterona
TAM	Macrófago associado a tumores
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases; Inibidores teciduais de metaloproteinases

TLR	Receptor Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAN	Versican
VCAM	Vascular cell adhesion protein 1
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Fctor Receptor
VKINA	Versikina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Câncer de mama em mulheres	19
2.2	Câncer de mama triplo negativo	21
2.3	Tumor mamário experimental transplantável: modelomurino 4T1	22
2.4	Microambiente tumoral	23
2.5	Matriz extracelular.	24
2.6	Versican e versicanases	26
2.7	Inflamação no câncer	30
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Cultivo celular e modelo singênico 4T1	36
4.2	Processamento e análise histopatológica	36
4.3	Aspectos éticos	37
4.4	Análise imuno-histoquímica	37
4.5	CrITÉRIOS de avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos	38
4.6	Imunofenotipagem D e sangue periférico e tumorprimário	38
4.7	Análise do colágeno da matriz extracelular	40
4.8	Análise estatística	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Caracterização do tumor 4T1	42
5.2	Análise histopatológica	44
5.3	Caracterização morfológica de colágeno na matriz extracelular tumoral	47
5.4	Expressão de versican, versikina, ADAMTS1, 5 E 15 em estroma peritumoral e células murinas 4T1	50
5.4.1	Análise da expressão de Versican (VCAN) em estroma e células neoplásicas	50

5.4.2	Análise da expressão de Versikina (VKINA) em estroma e células neoplásicas	51
5.4.3	Análise da expressão de ADAMTS1 em estroma e células neoplásicas	52
5.4.4	Análise da expressão de ADAMTS5 em estroma e células neoplásicas	53
5.4.5	Análise da expressão de ADAMTS15 em estroma e células neoplásicas	54
5.4.6	Fotomicrografias da expressão de VCAN, VKINA e as enzimas ADAMTS1, 5 e 15	55
5.5	Expressão de versican, versikina, adamts1, 5 e 15 no parenquima pulmonar	57
5.6	Caracterização fenotípica de infiltrado inflamatório tumoral e sua relação com a proteólise de VCAN e seu proteólito	58
5.6.1	Endereçamento de linfócitos e células de origem mieloide para o sítio tumoral	58
5.6.2	Resposta imune linfocítica e relação com expressão de VCAN em tumor 4T1	62
5.6.3	Perfil de células mielóides e relação com expressão de VCAN em tumor 4T1	63
5.6.4	Relação de VKINA e infiltrado intratumoral de células mielóides em tumor 4T1	64
5.6.5	Relação entre ADAMTS 1, 5 e 15 e o infiltrado de células T e células mielóides em tumor 4T1	64
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	71
	REFERENCIAS	72
	ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres no mundo e a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer nas mulheres (INCA, 2021). Apesar dos avanços na pesquisa, esta doença continua sendo um grande problema de saúde, pois ainda há uma incidência de 2.026.000 de novos casos no mundo por ano, de acordo com o GLOBOCAN (2020), e no Brasil cerca de 66.280 casos anualmente (INCA, 2021).

Atualmente, sabe-se que o câncer de mama é classificado também quanto as suas características moleculares, categorizadas em tumores luminais A, luminais B, superexpressão de HER-2 e triplo negativos. O subtipo triplo negativo é conhecido por ser o mais agressivo com uma baixa resposta às terapias disponíveis pois a sua falta de expressão dos receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e super expressão da proteína HER-2 faz que não haja resposta a tratamentos específicos que visam esses receptores, como terapias hormonais direcionadas ou terapia alvo HER-2 (HAN et al., 2023). Isso faz com que o tratamento de tumores triplo negativos seja mais desafiador em comparação com outros subtipos de câncer (ANASTASIADI, *et al.*, 2017, STEENBRUGGE, *et al.*, 2017). Essas características conferem maior risco de recidivas precoces até 3 anos após o diagnóstico, desenvolvimento de metástases viscerais e/ou cerebrais e uma menor sobrevida global (LIN et al., 2008; COLLINGNON et al., 2016).

Sabe-se que o microambiente tumoral tem um importante papel na progressão de tumores agressivos, como no câncer triplo negativo, bem como no desenvolvimento das metástases (ALBINI; SPORN, 2007). Esse microambiente consiste em células tumorais, células do estroma não tumorais, incluindo fibroblastos, células endoteliais, mioepiteliais e células inflamatórias, como macrófagos, células T, Natural Killer (NK) e células dendríticas, além da matriz extracelular (MEC) responsável pela sustentação do tecido (SUND; KALLURI, 2009). Estes elementos estão envolvidos nas principais características do câncer, como o escape da vigilância imunológica, ativação da angiogênese, proliferação, invasão e metástase, além de dar suporte à resistência terapêutica (ZHANG, *et al.*, 2019, DOS REIS, *et al.*, 2019).

Durante a progressão tumoral, a MEC e seus elementos sofrem degradação pela ação das enzimas liberadas pelas células cancerosas, fibroblastos e células da resposta imune inata, gerando fragmentos com ação imunomoduladora. Dentre os elementos da MEC, o proteoglicano versican (VCAN) está exposto a ação destas enzimas uma vez que sua expressão se apresenta aumentada em

processos inflamatórios e neoplásicos (CANAVESE, et al., 2011, HOPE, et al., 2016). Várias proteases atuam como versicanases, regulando a expressão deste proteoglicano, como por exemplo as ADAMTSs (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) (BINDER, et al., 2017). Estas enzimas pertencem ao grupo de metaloproteinases dependentes de zinco que possuem características semelhantes à desintegrina (LAMBERT, et al., 2020). O VCAN regulado pelas ADAMTS pode gerar um subproduto chamado versikina (VKINA). Esse proteólito está relacionado com o processo inflamatório de forma favorável à progressão tumoral, angiogênese e desenvolvimento de metástases, exercendo o papel de matriquina. Sabe-se que matriquinas atuam como padrão molecular associado ao dano (do inglês *Damage Associated Molecular Patterns*, DAMP), se ligam ao Receptor *Toll-like* (TLR) e, desta forma, são capazes de ativar resposta imune (FREY et al., 2013; EBLE, J. A.; NILAND, S., 2019).

Através da interação com o heterodímero (TLR2/TLR6) e com CD14, VKINA, por exemplo, pode ativar as células mieloides infiltrantes de tumor para estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 e promover metástase (FREY et al., 2013). Os efeitos deste proteólito na diferenciação de macrófagos também já foram relatados em mieloma múltiplo (GUPTA et al., 2017; HOPE et al., 2014, 2016), bem como seu papel na infiltração de células T CD8⁺ e diferenciação de células dendríticas em câncer colorretal (HOPE et al., 2017). Entretanto, o conhecimento sobre o papel desta matriquina em outras células da resposta imune, ainda é escasso.

Nesse contexto, faz-se necessário maior investigação sobre a ação das proteases ADAMTS associadas a proteólise de VCAN em microambiente inflamatório do câncer de mama. Com intuito de investigar o câncer triplo negativo, o modelo murino 4T1 foi estabelecido como modelo para o estudo por possuir uma boa analogia com a progressão de neoplasia maligna mamária, permitindo monitorar as alterações do tecido, como crescimento, encolhimento e metástase sem serem rejeitados pelo sistema imunológico do hospedeiro (STEENBRUGGE, et al., 2019). Dessa forma, será possível avaliar a relação entre a degradação de VCAN pelas ADAMTSs e sua relação com células imunes da resposta imune no microambiente tumoral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de mama em mulheres

O câncer de mama é uma doença heterogênea com comportamentos distintos em termos de progressão e prognóstico, com etiologia multifatorial. Diversos fatores estão relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento tumoral, como: a idade, mulheres acima de 50 anos têm maiores riscos de desenvolver essa doença (INCA, 2020); os fatores ambientais como ingestão de bebidas alcoólicas, obesidade, ausência de atividades físicas e exposição frequente a radiação ionizante; os fatores endócrinos estão relacionados com uma maior exposição ao estímulo de estrogênio (endógeno ou exógeno) (ANASTASIADI et al., 2017); e, principalmente, as alterações genéticas hereditárias e somáticas. As alterações hereditárias são mutações que são passadas de geração através da linhagem familiar. Essas mutações podem aumentar significativamente o risco de uma pessoa desenvolver câncer de mama. A mutação mais conhecida associada a esse risco é a mutação nos genes *Breast Cancer gene* (BRCA) 1 e 2 (ADAMI et al., 2008). Além das mutações em BRCA1 e BRCA2, outras mutações genéticas também podem contribuir para a suscetibilidade hereditária ao câncer de mama. Essas mutações podem estar associadas a síndromes genéticas específicas, como a síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Cowden, entre outras (ABEN-ATHAR et al., 2021).

Já as alterações genéticas somáticas ocorrem nas células do corpo devido a fatores ambientais, como exposição a carcinógenos, radiação ou erros aleatórios durante a replicação do DNA. Algumas mutações somáticas podem resultar na ativação de oncogenes, genes que promovem o crescimento celular descontrolado e a formação de tumores. Por exemplo, a amplificação do gene HER-2 é associada a um subtipo agressivo de câncer de mama. Mutações em genes supressores tumorais, como TP53 (associado à síndrome de Li-Fraumeni) e PTEN (associado à síndrome de Cowden), podem levar à perda de controle do crescimento celular e aumentar o risco de câncer de mama (ZANETTI, 2015).

Para uma investigação de câncer de mama, é necessário um exame clínico das mamas e exames de imagem para diagnóstico preciso como por exemplo, ultrassom, mamografia ou ressonância magnética (SHAMSI; ISLAMIAN, 2017). A confirmação da doença só é feita por meio de biópsia, que consiste na retirada de um fragmento do nódulo ou da lesão suspeita por meio de

citologia aspirativa, punções ou exérese cirúrgica. A amostra do material retirado é encaminhada para análise citopatológica ou anatomopatológica (BONILLA et al., 2017).

Análises moleculares sugerem que o carcinoma humano pode ser subclassificado em pelo menos quatro grupos principais que consistem em Luminal A, Luminal B, triplo-negativo e HER2+, e seis subtipos intrínsecos que são *basal-like 1*, *basal-like 2*, imunomodulador, mesenquimal, mesenquimal tipo tronco e receptor de androgênio luminal (ANASTASIADI et al., 2017). O subtipo Luminal A possui tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 e apresenta um índice de Ki-67 inferior a 14%, por isso tem um melhor prognóstico, com taxas mais altas de sobrevivência e baixas taxas de recorrência. Por conta do fato destes tumores apresentarem RE+, o tratamento para esses tumores normalmente inclui terapia hormonal (WON; SPRUCK, 2020). O subtipo Luminal B já não possui um bom prognóstico como o A, pois pacientes com este subtipo são geralmente diagnosticados com tumores em estágios mais avançados e com linfonodos positivos, expressão de genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes como o Ki-67.

A expressão de RE, RP, HER2 e mais recentemente a utilização do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B (LEBERT et al., 2018). Já o triplo negativo é considerado o grupo de pior prognóstico devido à ausência de receptores hormonais e HER2, desta forma nenhuma das terapias atuais são plenamente eficazes para esse tipo de câncer (LIN et al., 2008). O quarto subtipo, HER2+, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais. Esse subgrupo representa o segundo pior prognóstico em relação aos demais e as pacientes acometidas estão mais propensas a recorrência precoce e desenvolvimento de metástases, apesar de responderem bem às terapias com alvo biológico anti-HER2 (COLLINGNON et al., 2016).

Embora esses sistemas de classificação contribuam para o manejo clínico dessa doença, eles não conseguem capturar a ampla diversidade molecular do câncer de mama. Nessas circunstâncias, abordagens complementares são importantes para contemplar essa variedade e validar alvos terapêuticos relevantes (FEDERICO; CHONG; ZHANG, 2017).

2.2 Câncer de mama triplo negativo

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é definido como um tipo de câncer de mama com expressão negativa de estrogênio (ER), progesterona (PR) e receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (YIN et al., 2020). O CMTN ocorre principalmente em mulheres jovens na pré-menopausa com menos de 40 anos de idade, e representam aproximadamente 15 a 20% de todas as pacientes com câncer de mama (GONG et al., 2021). Em comparação com os outros grupos de câncer de mama, o tempo de sobrevivência das pacientes CMTN é menor e a taxa de mortalidade é de 40% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico por ser um subtipo altamente invasivo (YIN et al., 2020).

Existem 6 subtipos de CMTN que se baseiam no prognóstico da doença e na resposta da terapia. Esses subgrupos são nomeados de acordo com seus padrões de expressão molecular: basal-like 1 e 2 (BL1 e BL2), imunomodulador (IM), mesenquimal (M), tipo tronco mesenquimal (MSL) e receptor de andrógeno luminal (LAR) (SPORIKOVA; KOUDELAKOVA, 2018). Os subtipos BL1 e BL2 são sensíveis a agentes prejudiciais ao DNA e têm expressão elevada no ciclo celular e resposta a danos ao DNA. Os perfis de expressão gênica dos subtipos M e MSL se sobrepõem aos do câncer de mama metaplásico quimiorresistente e exibem a regulação positiva dos genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal, motilidade celular, remodelamento da matriz extracelular e diferenciação celular (LI YIN et al., 2020). O subtipo IM é caracterizado pelo aumento da expressão de genes de sinalização imunológica (sinalização de células imunes e citocinas, e apresentação de antígenos pelas vias principais de sinalização imunológica (LEHMANN et al., 2011). Já o subtipo LAR é enriquecido em genes envolvidos na sinalização hormonal, síntese de esteróides e metabolismo de estrogênio, incluindo superexpressão do receptor de andrógeno (AR). Pacientes com o subtipo LAR apresentam menor sobrevida livre de recaídas (SPORIKOVA; KOUDELAKOVA, 2018).

Devido ao seu fenótipo molecular, o CMTN não é sensível a terapias endócrinas ou a terapias moleculares direcionadas. Logo, a quimioterapia é o principal tratamento, mas a eficácia da quimiorradioterapia adjuvante pós-operatória convencional é reduzida. As lesões metastáticas residuais eventualmente levarão à recorrência do tumor. O fármaco bevacizumab tem sido usado em combinação com medicamentos quimioterápicos para tratar o CMTN em algumas áreas, mas o tempo de sobrevivência dos pacientes não aumentou significativamente (BERGIN et al., 2019).

Além dele, a imunoterapia, que estimula o sistema imunológico a atacar as células cancerígenas, está sendo investigada como uma abordagem para câncer de mama triplo negativo. Inibidores de checkpoint imunológico, como os que atuam em PD-1 e PD-L1, estão sendo testados em ensaios clínicos (LI et al., 2022).

A heterogeneidade do CMTN é evidente em seu tratamento, logo os diferentes subtipos diferem tanto na atividade proliferativa quanto na resposta ao tratamento convencional (quimioterapia); então, as abordagens terapêuticas clássicas devem considerar qual subtipo está sendo direcionado até que opções personalizadas estejam disponíveis nesse âmbito (HUBALEK et al., 2017).

2.3 Tumor mamário experimental transplantável: modelo murino 4T1

Modelos murinos de doenças ajudaram a desvendar vias moleculares altamente conservadas e reguladores envolvidos na oncogênese humana. Vários modelos murinos de metástases espontâneas de câncer de mama foram desenvolvidos para estudar os mecanismos moleculares na progressão e metástase de células tumorais de mama e para serem usados para testagem de agentes terapêuticos (GUO et al., 2020).

A maioria dos exemplos murinos são de tumores genéticos que por mais que sejam excelentes para estudos mecanicistas, não são adequados para testar agentes terapêuticos, já que as metástases levam meses para se desenvolver nesses modelos genéticos espontâneos, exigindo assim uma administração a longo prazo dos agentes antineoplásicos (YANG; ZHANG; HUANG, 2012). No entanto, um modelo de metástase induzida tem as vantagens da progressão tumoral a curto prazo e do fácil rastreamento da progressão do tumor em camundongos vivos, como acontece com câncer de mama murino ortotópico 4T1 (GUO et al., 2020). Neste caso, as células tumorais 4T1 são transplantadas no tecido adiposo mamário para o desenvolvimento de nódulos tumorais primários e apresentam alta capacidade invasiva (SCHRÖRS et al., 2020). A maioria dos camundongos portadores deste tumor desenvolvem metástases em aproximadamente 30 dias após o transplante tumoral. No entanto, os tumores 4T1 crescem agressivamente nos locais primários e se espalham para órgãos/tecidos secundários a partir do seu local inicial. Nesta fase, muitas vezes surgem as micrometástases, caracterizadas por pequenos grupamentos de células neoplásicas espalhadas em linfonodos drenantes e órgãos, como pulmão e fígado (SCHRÖRS et al., 2020).

O modelo 4T1 foi estabelecido para o estudo em oncologia por possuir uma boa analogia com a progressão da neoplasia, permitindo monitorar as alterações do tecido, como crescimento, encolhimento e desenvolvimento de metástase sem serem rejeitados pelo sistema imunológico do hospedeiro (STEENBRUGGE, et al., 2019).

Nos últimos 20 anos, houve muitas publicações com câncer de mama metastático murino. Modelos singênicos com implantação de células 4T1 marcadas com luciferase de vagalume em camundongos imunocompetentes podem ser usados para rastrear a eficácia da droga *in vivo* usando tecnologia bioluminescente (RASHID et al., 2017). Este tipo de estudo leva em consideração a resposta imune antitumoral do animal, interações câncer-estroma, o microambiente mamário e demonstram reproduzir as etapas de progressão e metástase do câncer mais eficientes do que tumores de xenoinxertos (RASHID; NAGAHASHI; RAMACHANDRAN, 2016).

Devido à alta capacidade de exibir metástases nos mesmos sítios afetados pelo câncer de mama humano, o modelo de carcinoma mamário murino 4T1 representa um sistema ideal para o estudo de metástases, terapias, técnicas moleculares, celulares e patológicas de câncer de mama em diversos órgãos/tecidos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

2.4 Microambiente tumoral

Recentes estudos demonstram que a análise do microambiente tumoral é crucial para uma melhor compreensão do câncer de mama. O microambiente tumoral é complexo e dinâmico. Ele é composto por uma variedade de componentes, incluindo células tumorais, células estromais, vasos sanguíneos, células imunes, matriz extracelular e fatores solúveis (EDECHI, et al., 2021). O microambiente tumoral desempenha um papel crucial no crescimento, progressão e resposta ao tratamento do câncer. A compreensão dessa complexa rede de interações é fundamental para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e direcionadas (HINSHAW; SHEVDE, 2019). As células tumorais interagem com outros componentes do microambiente e liberam sinais que afetam o comportamento das células vizinhas (BAGHBAN et al., 2023), como exemplo liberando fatores de crescimento que promovem a angiogênese.

As células estromais no microambiente tumoral são os fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas. Essas células desempenham um papel na manutenção da estrutura e função

dos tecidos, mas no microambiente tumoral, elas podem ser usadas pelas células cancerígenas para promover o crescimento tumoral (ZHANG et al, 2020; WANG et al., 2023). As células imunes, como linfócitos T, células Natural Killer (NK), células dendríticas e macrófagos, estão também presentes no microambiente tumoral. Elas podem ter papéis tanto protetores (atacando as células cancerígenas) quanto facilitadores (promovendo a evasão imunológica) (WANG et al., 2023).

No câncer de mama, as células estromais podem ser recrutadas pelo tumor e influenciar negativamente a resposta imunológica (FREIRE, 2019). Essas células podem secretar fatores que suprimem a atividade das células imunes, criando um ambiente imunossupressor que permite que as células cancerígenas escapem da detecção e da destruição (GONZALEZ, HAGERLING, WERB, 2018). Além disso, as células tumorais podem explorar os mecanismos de controle do sistema imunológico para evadir a resposta imune. Uma das estratégias é a expressão de moléculas que se ligam a receptores de células T, como o PD-1, impedindo que as células imunes ataquem as células cancerígenas (GONZALEZ, HAGERLING, WERB, 2018). Inibidores de *checkpoint* imunológico, como os que atuam em PD-1 e PD-L1, bloqueiam essas interações, permitindo que as células T ataquem as células cancerígenas.

Embora tenha havido progresso significativo no tratamento do câncer de mama, a metástase ainda é desafiante, uma vez que é responsável por mais de 90% das mortes por essa doença (JHAN; ANDRECHEK, 2017). Nesse processo de progressão tumoral, as células sofrem transição epitelial para mesenquimal e atuam na remodelação da MEC liberando metaloproteínases que degradam as proteínas da matriz extracelular. Esses processos facilitam em conjunto o escape das células cancerosas do local do tumor primário para a circulação e depois para os demais órgãos (FARHOODI et al., 2020).

2.5 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional que está presente em todos os tecidos do corpo humano e é essencial para a vida. Cada órgão tem uma MEC com composição única que é gerada nos estágios iniciais embrionários (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014). A função da MEC vai além de fornecer suporte físico para a integridade e elasticidade do tecido, ela também é uma estrutura dinâmica que é frequentemente remodelada para controlar sua homeostase (BOONNANS et al., 2015). Sua importância é comprovada, por exemplo, pela

letalidade embrionária causada por mutações em genes (ex.: BRCA1) que codificam componentes da MEC e essas modificações genéticas podem levar à perda da proteção contra transformações celulares, podendo ser mais suscetível a progressão do carcinoma (BONNANS et al., 2015).

A MEC é composta por cerca de 300 proteínas, incluindo o colágeno, proteoglicanos (PGs) e glicoproteínas. Os colágenos são as principais proteínas estruturais da MEC e são classificados em formas fibrilares (colágenos I-III, V e XI) e não fibrilares. As fibrilas de colágeno fornecem resistência à tração à MEC, limitando o aumento dos tecidos. Glicoproteínas, como a elastina, também têm um papel importante na montagem da MEC, estão envolvidos na interação matriz-célula, atuando como ligantes para receptores de superfície celular, como as integrinas. Elas também funcionam como um reservatório de fatores de crescimento que estão ligados à MEC e podem ser liberados após a proteólise (ISLAM et al., 2020). Os PGs são proteínas centrais com cadeias laterais de glicosaminoglicanos ligados (GAG) e são intercaladas entre as fibrilas de colágeno (BONNANS; CHOU; WERB, 2014), a exemplo do proteoglicano de sulfato de condroitina versican. Estes preenchem o espaço intersticial extracelular e conferem a hidratação, retendo a água dentro do tecido (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

Os glicosaminoglicanos (GAGs), componente central e estruturante dos PGs, se ligam a muitos fatores de crescimento, que os sequestraram na MEC modulando assim a sinalização das células cancerígenas e das células estromais. Isso pode influenciar a proliferação, a migração e a angiogênese das células tumorais (NAJAFI et al., 2018). Além disso, a interação entre proteoglicanos e fatores de crescimento também pode afetar a adesão celular e a remodelação da matriz extracelular, contribuindo para a invasão e metástase das células cancerígenas. Essa interação complexa pode influenciar o comportamento das células tumorais, sua resposta ao tratamento e a progressão da doença (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

As ligações entre células e matriz extracelular controlam a orientação da estrutura interna de cada célula (FARHOODI; SEGALINY; WAGONER, 2020). As junções entre as células criam uma comunicação, permitindo que as células compartilhem sinais que regulem seu padrão de expressão gênica e sua estrutura. A formação e a destruição das ligações mudam o jeito como as células se movem no organismo, orientando-as durante o crescimento, o desenvolvimento e o reparo celular. Dessa forma, os mecanismos de adesão celular a matriz extracelular é crítica para cada um dos aspectos da organização, função e dinâmica das estruturas das células (BINDER et al., 2017). Existem dois tipos principais de MEC que diferem em relação à sua localização e

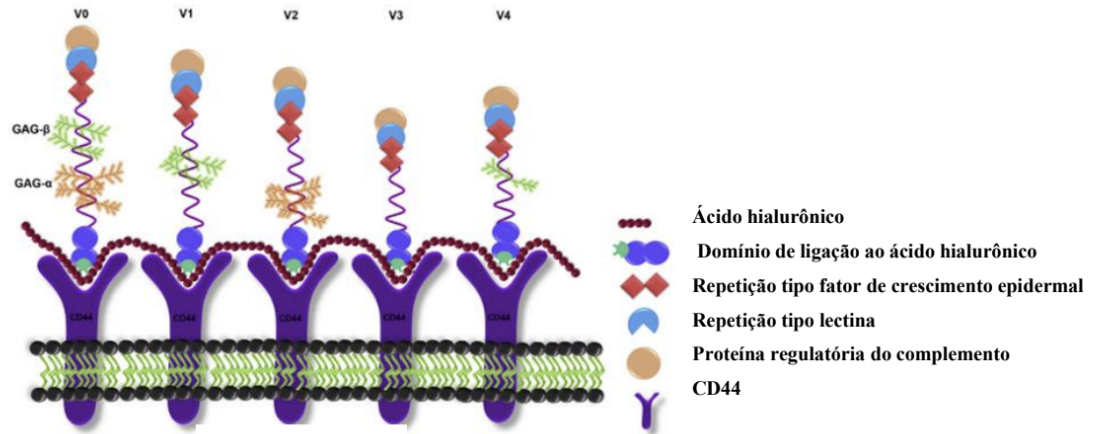
composição: a matriz de tecido conjuntivo intersticial, que envolve as células e fornece andaimes estruturais para os tecidos; e a membrana basal, que é uma forma especializada de MEC que separa o epitélio do estroma circundante (HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

À medida que as células tumorais proliferam, a MEC circundante sofre mudanças na sua arquitetura importantes em uma interação dinâmica entre o microambiente e as células residentes. Essas alterações mostram que a progressão do tumor exige uma interação contínua entre a MEC e as células tumorais (NAJAFI et al., 2018). O aumento da deposição de proteínas da matriz promove a progressão tumoral, interferindo na adesão célula-célula, consequentemente amplificando a sinalização do fator de crescimento (PICKUP et al., 2014). A visualização do tecido circundante às células epiteliais durante a metástase tumoral revelou organização e alinhamento da matriz localizada ao longo da borda de ataque de tumores invasivos (WALKER et al., 2018). De fato, observou-se que a invasão celular local desses tumores é orientada ao longo de fibras colágenas alinhadas, sugerindo que a linearização das fibras colágenas facilita a invasão tumoral (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2015). Acredita-se que essas fibras de colágeno densamente alinhadas atuem como trilhas para a proliferação de células neoplásicas migrarem para fora do tumor. Nesse processo de invasão, proteoglicanos e enzimas proteolíticas são de extrema relevância para o remodelamento da MEC e manutenção de um microambiente favorável a progressão tumoral.

2.6 Versican e versicanases

Versican (VCAN) é um proteoglicano contendo sulfato de condroitina que é sintetizado por uma variedade de células e é um dos principais componentes da matriz extracelular, que fornece uma matriz solta e hidratada durante os principais eventos do desenvolvimento embrionário e em processos patológicos (JHAN; ANDRECHEK, 2017). Existem 5 variantes diferentes geradas pelo *splicing* alternativo dos éxons 7 e 8 internos que codificam dois domínios de glicosaminoglicanos na proteína central, como demonstrado na figura 1 (PAPADAS; ASIMAKOPOULOS, 2020). Essas variantes diferem no tamanho da proteína principal e no número de cadeias CS conectadas. Enquanto as variantes V0 e V1 do VCAN carregam cadeias CS e são as principais formas que se acumulam em processos inflamatórios e patológicos, a variante V3 não possui cadeias CS e não é alterado de forma significativa na doença. Já a variante V4, ainda pouco estudada, consiste apenas

nos domínios G1 e G3, umaporção N-terminal e outra C-terminal, respectivamente. A presença de V4 foi descrita em casos de câncer de mama humano, onde apresentou-se regulada positivamente. Sua função ainda não é bem esclarecida (KISCHEL et al., 2010; PAPADAS et al., 2020).



Estrutura e isoformas de Versican. Adaptado de Binder et al., 2017

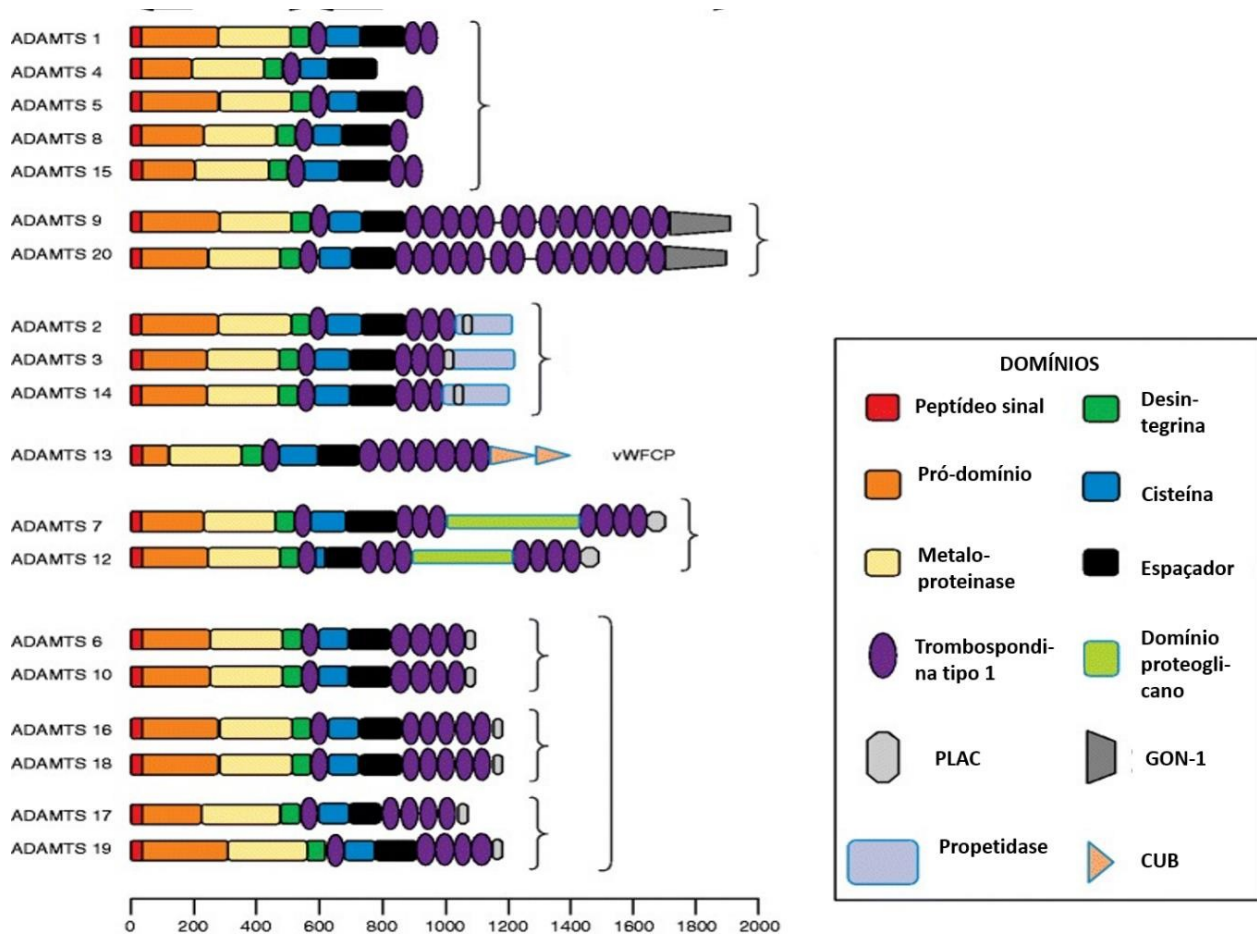
Fonte: (BINDER et al., 2017)

VCAN é uma molécula complexa que consiste em domínios modulares de proteínas centrais e cadeias laterais de glicosaminoglicanos, e existem várias etapas de síntese e processos que as regulam (PAPADAS; ASIMAKOPOULOS, 2020). Apresenta cerca de 86% de homologia entre as espécies murina e humana (NASO et al., 2016), indicando a importância e a natureza altamente conservada deste proteoglicano. Esta molécula participa da adesão, proliferação, migração celular e angiogênese, desempenhando um papel central na morfogênese e manutenção dos tecidos. Além disso, o versican contribui para o desenvolvimento de vários processos patológicos, como por exemplo o câncer (CANAVESE et al., 2011).

Quando superexpressa na MEC, VCAN está sujeito a clivagem por enzimas proteolíticas com as da família ADAMTs, conhecidas como versicanases. Assim, é gerado um proteólito chamado VKINA, um bioativo produto da ação de uma ADAMTS específica na ligação Glu441-Ala442, no domínio GAG-β das isoformas V0 e V1 (RASHID et al., 2016). A VKINA está relacionada com o processo inflamatório, exercendo o papel de matriquina, asquais atuam como padrão molecular associado ao dano se ligando ao Receptor Toll-like (TLR) e, desta forma, são capazes de ativar a resposta imune inata (FREY et al., 2013; EBLE; NILAND, 2019). Esses fragmentos de VCAN também são capazes de provocar atividades biológicas, como a promoção

da morte celular (apoptose) (NANDADASA;FOULCER; APTE, 2014). A função de VKINA no microambiente ainda é bastante estudado, podendo atuar de forma favorável ou desfavorável à progressão tumoral, angiogênese e desenvolvimento de metástases.

As ADAMTS são metaloproteinases (MMPs) secretadas que desempenham papéis fundamentais na formação, homeostase e remodelação da MEC, sendo descritas até o presente momento 19 isoformas. O espectro de substrato das proteases ADAMTS pode variar de proteínas individuais da MEC a famílias inteiras de proteínas, como os hialectanos (LAMBERT et al., 2020). Estas enzimas extracelulares apresentam uma montagem complexa e estão, estruturalmente, organizadas em um domínio proteinase e um domínio auxiliar. O domínio proteinase compreende os domínios sinal, metaloproteinase e desintegrina. A maior variabilidade entre os membros da ADAMTS é encontrada no domínio auxiliar, que é composto por uma ou mais repetições de sequência de trombospondina tipo 1 (TSRs), um domínio rico em cisteína e um domínio espaçador. Alguns membros da família também têm um ou mais domínios especializados como parte de seu domínio auxiliar, demonstrado na figura 02.



The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family.

Figura 2 - Organização do domínio básico dos 19 membros da família ADAMTS e seus principais grupos funcionais adaptada.

Fonte: (KELWICK, Richard et al. 2015, p. 113)

A clivagem de substrato mediada por ADAMTS é necessária para a formação, remodelação e adaptação fisiológica da MEC às necessidades de tecidos e sistemas de órgãos individuais. As ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15 e -20 demonstraram clivar VCAN, sendo conhecidas como versicanases (NANDADASA; FOULCER; APTE, 2014).

No entanto, as proteases ADAMTS também podem estar envolvidas, indiretamente, na destruição de tecidos, como acontece no câncer de mama (LAMBERT et al., 2020). Eles participam da degradação inicial da membrana basal, facilitando a invasão de células malignas no tecido conjuntivo através da degradação restrita de proteínas da MEC. Além disso, os fragmentos resultantes do processamento de proteínas da matriz estão relacionados a importantes controles regulatórios, tanto de natureza inibitória quanto estimulatória (BINDER et al., 2017). Dessa forma, as modificações do meio extracelular surgiram como um mecanismo básico para a regulação do

reparo de vasos, progressão da aterosclerose, bem como estimulação e inibição da angiogênese (LAMBERT et al., 2020).

As ADAMTSs mostram suscetibilidade restrita à inibição pelos quatro inibidores teciduais de metaloproteinases, os TIMPs. Além dos TIMPs, a atividade dessas enzimas também é controlada por sua internalização, degradação e regulação por citocinas, fatores de crescimento, hormônios e mediadores inflamatórios, como por exemplo IL-10 que inibe as ADAMTSs 1 e 5 (KELWICK et al., 2015).

2.7 Inflamação no câncer

O sistema imunológico é conhecido por desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento do câncer (PAPADAS; ARAUZ; CICALA, 2020). Quando se trata do câncer de mama, a interação entre as células cancerígenas e o sistema imunológico é extremamente complexa e influencia diretamente a evolução da doença. O sistema imune constantemente patrulha o corpo em busca de células anormais, incluindo as células cancerígenas, através de um processo chamado imunovigilância (CASSIANO, 2022). As células NK e os linfócitos T citotóxicos desempenham um papel importante na identificação e destruição das células cancerígenas.

Em resposta à lesão tecidual, uma rede de sinais químicos inicia e mantém uma resposta projetada para reparar o tecido afetado. Isso envolve a ativação e migração de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) para o local da lesão (SINGH et al., 2019). Para a migração dos leucócitos, há uma ativação da L-selectina de moléculas de adesão (L-selectina) que facilitam a rolagem ao longo do endotélio vascular; (LIEW; KUBES, 2019) desencadeamento de sinais que ativam e regulam positivamente as integrinas leucocitárias mediadas por citocinas e moléculas ativadoras de leucócitos; imobilização das células na superfície do endotélio vascular por meio de adesão e transmigração através do endotélio para locais de dano, facilitadas pelas MMPs (BARBEIRO et al., 2015).

O perfil de citocinas que são secretadas em microambiente inflamatório é importante no desenvolvimento de doenças crônicas. A citocina pró-inflamatória TNF- α (fator de necrose tumoral- α) controla as populações de células inflamatórias, bem como muitos dos outros aspectos do processo inflamatório (GERADA; RYAN, 2020). As células tumorais produzem diversas citocinas que atraem os leucócitos. O componente inflamatório de uma neoplasia em

desenvolvimento pode incluir uma população diversificada de leucócitos todoscapazes de produzir uma variedade de citocinas, mediadores citotóxicos, incluindo MMPs emediadores solúveis de morte celular, como TNF- α , interleucinas e interferons (IFNs) (MURALIDHARAN; MANDREKAR, 2013). As células dendríticas também migram para o tecido periférico inflamado, onde capturam antígenos e, após a maturação, migram para os linfonodos para estimular a ativação dos linfócitos T (SINGH et al., 2019).

O sistema imunológico inato fornece a primeira linha de defesa do hospedeiro contra o câncer. O reconhecimento de patógenos por receptores de reconhecimento padrão (PRR) induz a ativação de vias de sinalização específicas em células imunes inatas (LIEW; KUBES, 2019). As células envolvidas em respostas imunes inatas são os mastócitos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK. Cada um desses subconjuntos celulares monta respostas específicas e desempenha funções distintas para a indução de inflamação durante a carcinogênese (VESELY et al., 2011). Aqui destacaremos o papel dos monócitos, macrófagos, células dendríticas e células NK no infiltrado tumoral, objetos de estudo deste trabalho.

As células mais proeminentes do sistema imunológico inato são os monócitos, macrófagos e DCs, que reconhecem Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio de Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como TLRs, NLRs Receptores do tipo NOD (NLRs) e Receptores do tipo RIG (RLRs), e fagocitam patógenos diretamente para degradá-los intracelularmente. As células imunes inatas reconhecem amplos grupos de patógenos, como bactérias e vírus, por meio de componentes que são conservados dentro de cada grupo (SINGH et al., 2019).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) compõe importantes elementos do infiltrado inflamatório em neoplasias e são derivados de monócitos. Os TAMs produzem uma série de fatores fortes de crescimento angiogênico e linfangiogênico, citocinas e proteases, todos mediadores que potencializam a progressão neoplásica (MURALIDHARAN; MANDREKAR, 2013). Em estudo com melanomas e câncer cervical, além de alterar o equilíbrio local de fatores pró-angiogênicos no desenvolvimento tumoral, os autores demonstraram que as TAMs expressavam VEGF-C e VEGF-D, bem como o receptor VEGF-3 (VEGFR-3), elementos importantes para formação de vasos linfáticos e metástases linfáticas (CORTÉS et al., 2017). Ao colocar as TAMs no centro do recrutamento e da resposta a estímulos angiogênicos e linfangiogênicos, elas podem promover a disseminação de tumores. Os TAMs também induzem a expressão de VCAM-1 nas células

mesoteliais; acredita-se ser também um passo fundamental para a disseminação de células tumorais (CHENG et al., 2021).

As células NK matam as células infectadas pela liberação de proteínas formadoras de poros chamadas perforinas e enzimas proteolíticas chamadas granzimas. As células NK monitoram e reconhecem as células alvo por sua baixa expressão superficial da autoproteína MHC I (RAUTELA et al., 2018). Além das interações tumorais diretas, a atividade citolítica de NK pode ser induzida por meio de células dendríticas ativadas por peptídeos antigênicos solúveis. Em melanomas, as células NK infiltram-se pouco nos sítios primários e acumulam-se principalmente no espaço peritumoral, porém, durante a regressão, podem ser observadas mais dispersas pelo tecido tumoral (LEI XU et al. 2020). Diferente da resposta inata, a imunidade adaptativa ou adquirida é uma resposta específica para um dado antígeno, que pode matar células cancerígenas e gerar uma memória imunológica de cada antígeno relacionado ao tumor (XIA et al., 2021). Isso cria um reservatório de células imunes capazes de responder a futuras células cancerígenas que expressam o mesmo antígeno. A imunidade adquirida consiste em linfócitos T e B, que atacam as células tumorais a partir do reconhecimento de antígenos tumorais pelas células T auxiliares CD4+, desencadeando uma resposta humoral mediada pelas células B, consequentemente produzindo anticorpos que reconhecem antígenos tumorais (WU et al., 2021). Em contraste com o sistema inato que fornece uma resposta relativamente inespecífica e rápida, o sistema adaptativo é caracterizado por respostas mais específicas orquestradas pelas células T frente a cada antígeno (MESQUITA et al., 2010).

As células T CD4 se diferenciam em subtipos distintos, incluindo os subtipos TH1 e TH2. Os subtipos TH1 e TH2 representam diferentes direcionamentos funcionais das células T CD4, resultantes de respostas imunes adaptativas a diferentes tipos de patógenos (VAZ et al., 2007). Esses subtipos têm perfis de citocinas distintos e contribuem para a resposta imune de maneiras diferentes. As células TH1 produzem citocinas como IFN- γ , IL-2 interleucina-2 (IL-2) e TNF- α , já TH2 produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (ABBAS, 2015). O equilíbrio entre respostas TH1 e TH2 no microambiente tumoral é crucial. Um domínio excessivo de respostas TH2 pode contribuir para a progressão do câncer, enquanto uma resposta TH1 robusta é desejável para uma resposta antitumoral eficaz (ZHENG et al., 2021). Além disso, a proteína FOXP3 é um fator de transcrição que desempenha um papel importante na regulação do sistema imunológico, especificamente na diferenciação e função das células T reguladoras (Tregs) com a função de

suprimir respostas imunes excessivas (OLGUIN et al., 2018). No entanto, estudos têm mostrado que, em alguns casos, células não-Tregs também podem expressar FOXP3, incluindo algumas células T CD8. A expressão de FOXP3 em linfócitos T CD8 tem sido associada a funções regulatórias ou imunossupressoras, que podem influenciar a resposta antitumoral (CONDE et al., 2023).

Os linfócitos T CD8 desempenham um papel central na defesa antitumoral, pois são capazes de reconhecer e destruir células cancerosas que apresentam antígenos específicos do tumor. Essas células reconhecem peptídeos tumorais apresentados pelo MHC classe I nas células cancerosas. A ativação dos linfócitos T CD8 resulta na liberação de citocinas como IFN- γ , que promove a ativação de células imunes adicionais, como macrófagos, e aumenta a resposta imune contra o câncer (DI GIOACCHINO et al. 2022).

As células inflamatórias e as citocinas que as células T produzem, influenciam toda a massa tumoral, regulando o crescimento, a migração e a diferenciação de todos os tipos de células no microambiente tumoral, incluindo células neoplásicas, fibroblastos e células endoteliais (OZGA; CHOW; LUSTER, 2021). Posteriormente, as células neoplásicas também desviam mecanismos inflamatórios, como interações às selectinas, produção de MMP e funções de citocinas para favorecer a disseminação neoplásica e metástases. Sendo uma tentativa do tumor de alterar as funções das células imunes, favorecendo assim seu desenvolvimento (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2014).

As ações pró-tumorais das células inflamatórias incluem a liberação de fatores de crescimento e sobrevivência, a promoção da angiogênese e linfangiogênese, a estimulação ao dano ao DNA, o remodelamento da MEC para facilitar a invasão e a evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro (EL HAGE et al., 2008). Embora as respostas inflamatórias sejam inicialmente antitumorais, nos pacientes com câncer essa resposta é prejudicada. Isso pode surgir por dois mecanismos distintos mediados por tumores: uma falha em regular positivamente as citocinas anti-inflamatórias ou subversão da resposta do hospedeiro resultante da dessensibilização de receptores devido a altas concentrações de quimiocinas e citocinas (MULDER et al., 2019).

Estudos experimentais anteriores mostraram que as ADAMTSs possuem propriedades pró e anti-tumorigênicas, dependendo do tipo de tumor e do microambiente inflamatório (REDONDO-GARCÍA; et al., 2021). Nesse contexto, a ADAMTS1 mostrou-se capaz de alterar o estroma tumoral e a inflamação em modelo murino de câncer de mama, que resultou em maior crescimento

tumoral e metástases (RODRIGUEZ-BAENA, et al., 2018; TAN, et al., 2019). As ADAMTS4, ADAMTS5 e ADAMTS12 demonstraram-se regulatórias em cânceres gastrointestinais, correlacionando com a progressão do tumor (SHANG et al., 2020; HARAGUCHI et al., 2017; LI et al., 2020). No entanto, a ADAMTS18 apresentou um efeito antitumorígeno no câncer de pulmão (ZHANG et al., 2019).

Dessa forma, é importante uma maior análise e estudo sobre a ação das versicanases associadas à proteólise de versican na inflamação do câncer de mama para que seja possível encontrar uma relação da expressão das enzimas ADAMTS no sítio tumoral com o infiltrado de células inflamatórias e no desenvolvimento de metástases em modelo murino 4T1.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a relação entre expressão das ADAMTSs e proteólise de versican em microambiente inflamatório tumoral e nicho metastático em modelo murino 4T1.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a neoplasia e o remodelamento da matriz extracelular no sítio primário nos diferentes tempos de progressão tumoral no modelo murino singênico (4T1);
- Avaliar a expressão de enzimas proteolíticas ADAMTS 1, 5 e 15, VCAN e seu proteólito VKINA, em tumor primário e metastático;
- Caracterizar a resposta imune associada ao processo de proteólise de VCAN em microambiente inflamatório no sítio tumoral primário.

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivo celular e modelo singênico 4T1

A linhagem de células 4T1 foi mantida em meio DMEN F12 (Hyclone, Logan, UT) suplementado com 10% de FBS, penicilina a 100µg/mL e estreptomicina 100µg/mL. A cultura de células 4T1 foi mantida à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Foram utilizados 36 camundongos BALB/c fêmeas a partir dos 45 dias de idade, divididos em 1 grupo controle (sem inóculo de células tumorais (n=4)) e 4 grupos (n=8) com inóculo de células tumorais 4T1. Inicialmente, 4 grupos de animais foram inoculados com células tumorais 4T1 heterotopicamente na região subcutânea do flanco direito.

O crescimento do tumor e o peso do animal foram medidos a cada 48 horas. O volume do tumor foi calculado pela fórmula: $\text{volume do tumor (mm}^3\text{)} = (\text{comprimento} \times \text{largura})^2 / 2$ (Reis et al., 2019). Aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação tumoral, os animais foram eutanasiados com anestésico (cetamina + xilasina 833 mg / kg via IP). Os tumores e pulmão foram dissecados, pesados e processados para análises histopatológicas, imuno-histoquímicas e de citometria de fluxo. Outros tecidos como linfonodos, baço, fígado, coração, rins e ossos também foram coletados e processados para confirmar metástase em exame histopatológico.

4.2 Processamento e análise histopatológica

Os fragmentos de tumor, pulmão e os demais órgãos foram fixados em solução formalina neutra tamponada com fosfato a 10% no período de 24 horas e em seguida processadas e incluídas em parafina. Cortes histológicos (4µm) foram obtidos e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricrômico de Masson e Picro-sírius para serem analisados em microscópio de luz Olympus BX-40. Para a análise de metástase foi realizada a contagem do número de nódulos metastáticos em lâminas coradas em HE, objetiva de 100x e 400x, contendo três fragmentos de cada lóbulo pulmonar esquerdo. Foram considerados nódulos metastáticos pulmonares, qualquer agrupamento de células neoplásicas distribuído por todo parênquima pulmonar, pleura, brônquios e bronquíolos. Células neoplásicas isoladas ou êmbolos de células neoplásicas não foram consideradas como metástases.

Foram realizadas duas repetições do experimento para colheita de material suficiente para as análises propostas.

4.3 Aspectos éticos

O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal da Fiocruz (Protocolo 015/2020).

4.4 Análise imuno-histoquímica

Para esta técnica, secções de 4µm foram obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, e submetidas à recuperação antigênica em calor-úmido (banho-maria a 95° por 20 minutos) com o tampão citrato/trilogy ou submetidas a reação enzimática com condroitinase a depender do anticorpo primário testado (Tabela 01). Posteriormente, todas as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio à 10% (Farmax) para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos e posterior bloqueio da atividade da proteína (Novolink™ Max Polymer Detection System) por 20 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas em PBS por 10 minutos. As secções histológicas foram incubadas com os anticorpos primários por 1 hora a 25°C, 30 min a 25°C ou overnight a 4°C, a depender do anticorpo utilizado, e na sequência aplicado o método de revelação polimérica (Novolink™ Max Polymer Detection System). Por último, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina (Novolink™ Max Polymer Detection System) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por soro normal e os controles positivos foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 1 - Respective clones, marcas, recuperações antigênicas, diluições, tempo de incubação dos anticorpos e controle positivo que são utilizados no experimento 4T1 no modelo murinho.

Anticorpos	Clone	Marca	Recuperação antigênica	Diluição do anticorpo	Incubação do anticorpo	Controle positivo
ADAMTS 1	3C8F4	Santa Cruz	Trilogy	1:50	1 hora	Fígado
ADAMTS 5	Ab4103 7	Abcam	Citrato	1:500	1 hora	Fígado
ADAMTS 15	561819	Invitrogen	Citrato	1:400	1 hora	Fígado
Versican	12C5	DSHB	Condroitinase	1:50	Overnight	Pele
Versikina	DPEAA E 1748A	Thermo Fisher	Citrato – EDTA	1:1000	30min	Pele

Fonte: Autora

4.5 Critérios de avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos

Os critérios para a marcação da expressão de VCAN, VKINA e ADAMTS foram baseados no sistema de score avaliado por Skandalis *et al.*, 2011 e adaptado por Damasceno *et al.*, 2016. A avaliação semiquantitativa do estroma e das células tumorais foi realizada, na qual inclui a porcentagem total do estroma ou células tumorais marcadas e a intensidade da marcação dos mesmos, considerada (1) como negativo ou fracamente marcado, (2) positivo fraco, (3) positivo moderado e (4) como positivo forte. Os graus de expressão foram então dados pela multiplicação da porcentagem (0-100%) pela intensidade (1-4).

4.6 Imunofenotipagem de sangue periférico e tumor primário

Após a realização do protocolo experimental, fragmentos do tumor de camundongo, representativos das áreas peri/intratumoral e 0,5 mL de sangue periférico em EDTA (concentração final 1mg/mL) foram avaliadas por citometria de fluxo. Os leucócitos e outras células do sangue periférico foram obtidos mediante lise osmótica com solução salina 0,3% de NaCl por 5 minutos e duas lavagens com solução salina a 0,9% de NaCl (300g) para reestabelecimento da osmolaridade. Uma vez obtidas, as células foram submetidas a marcação com anticorpos anti-CD3, anti-CD4,

anti-CD8, anti-IFN- γ , anti-TNF, anti-IL-10, anti-CD62L, anti-CD54, anti-FOXP3 e anti-PERF associados à fluorocromos (Tabela 02 e03). Para a caracterização do infiltrado inflamatório os fragmentos de tumor foram fragmentados e tamisados em malha microscópica de 45nm e submetidas a duas lavagens com solução salina a 0,9% de NaCl (300g). A suspensão de células tumorais foi submetida a marcação com os seguintes anticorpos monoclonais anti-IL-12, anti-IL-2, anti-MHCII, anti-CD106, anti-CD16/32, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD16 e anti- Arginase.

As células de sangue periférico e dos tumores foram adquiridas no citometro BD Fortessa, com um mínimo de 50.000 eventos selecionados pelos parâmetros FCS (tamanho) e SSC (complexidade) e os dados obtidos foram analisados usando o software FlowJo 7.0 (Becton Dickinson San Jose, CA, USA).

Tabela 2 - Respective anticorpos utilizados para o painel de citometria de linfócitos, macrófagos/monócitos, moléculas de adesão e outros tipos celulares

Células T	Macrófagos/Monócitos	Moléculas de adesão	Células
CD3	CD11b	CD54	CD16
CD4	CD11b IL-2	CD106	
CD62	CD11b IL-12		
FOXP3	CD11b MHC II		
PERF	CD11b CD16/32		
IFN- γ	CD11b Arg		
TNF- α			
IL-10			
TNF			

Fonte: Autora

Tabela 3 - Respectivos anticorpos utilizados para o painel de citometria, suas marcas e clones.

ANTICORPOS	MARCA	CLONE
CD4 APC	Invitrogen	MA5-28357
CD8 FITC	Elabscience	53-6.7
CD16/32	Elabscience	2.4G2
CD106	Elabscience	M/K - 2.7
IL-10	Elabscience	MP5 - 20F3
FOXP3	Elabscience	3G3
CD11b APC	Elabscience	M1/70
IL-2	Elabscience	JES6-5H4
PERFORIN	Elabscience	S16009A
MHC II	Elabscience	M5/114
TNF PeCy7	BD biosciences	Mab11
IFN PE CF 594	Bd biosciences	B27 562392
CD62L PE	abcam	Ab6632
CD54 PE	Santa Cruz	Sc-52553
Arg PE	Santa Cruz	Sc-271430
IL-12 BV 450	Abcam	Ab223592
CD16 FITC	abcam	Ab183354

Fonte: Autora

4.7 Análise do colágeno da matriz extracelular

Para análise e caracterização das fibras de colágeno, secções histológicas foram submetidas às colorações especiais. O Tricrômico de Masson foi utilizado para mensuração do colágeno total presente nas regiões peri e intratumoral. A coloração Picrosirius foi feita para caracterização do colágeno tipo I ou tipo III sob luz polarizada. Ambas as análises foram realizadas

capturando imagens 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) 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 estatística

Os resultados quantitativos obtidos que apresentarem distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, seguido de teste de médias. Foram realizados os testes de normalidade Kolmogorov-smirnov e Shapiro-wilk para avaliar a distribuição das variáveis. As diferenças entre os grupos foram observadas utilizando teste ANOVA para os dados paramétricos e o Kruskal Wallis para os dados não paramétricos. A correlação entre as variáveis foi analisada pelos testes de Pearson ou Spearman. Foram consideradas como significativas às associações, correlações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do *software* de estatística Grap Pad Instat v. 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do tumor 4T1

Após a inoculação das células tumorais, os camundongos foram pesados a cada 48h para acompanhar o crescimento do carcinoma mamário induzido. Foi observado um aumento do peso desses animais ao longo do experimento realizado, concomitante a evolução tumoral ao longo de 28 dias de acompanhamento (Figura 03). O crescimento do tumor foi avaliado pela medida do volume realizada a cada 48h até o dia da eutanásia, ilustrado na figura 04.

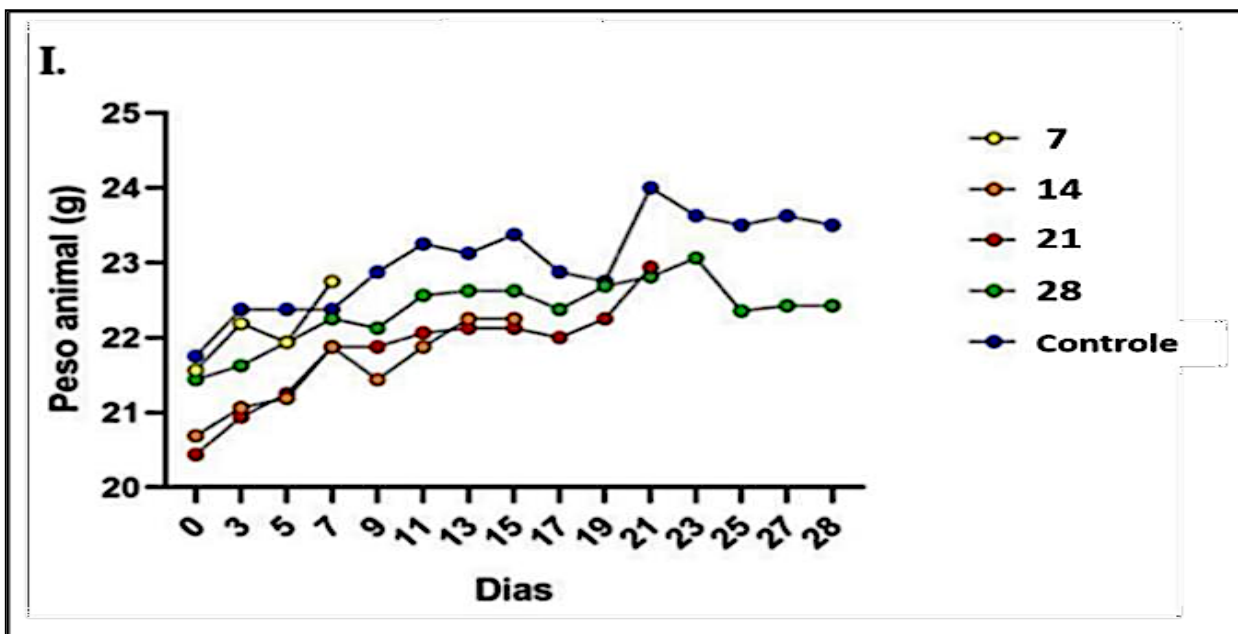


Figura 3 - Peso dos camundongos nos grupos de 7 (Amarelo), 14 (Laranja), 21 (Vermelho) e 28 dias (Verde) de acompanhamento após inoculação de células tumorais murinas 4T1, além do grupo controle (Azul), sem inóculo de células no experimento.

Fonte: Autora

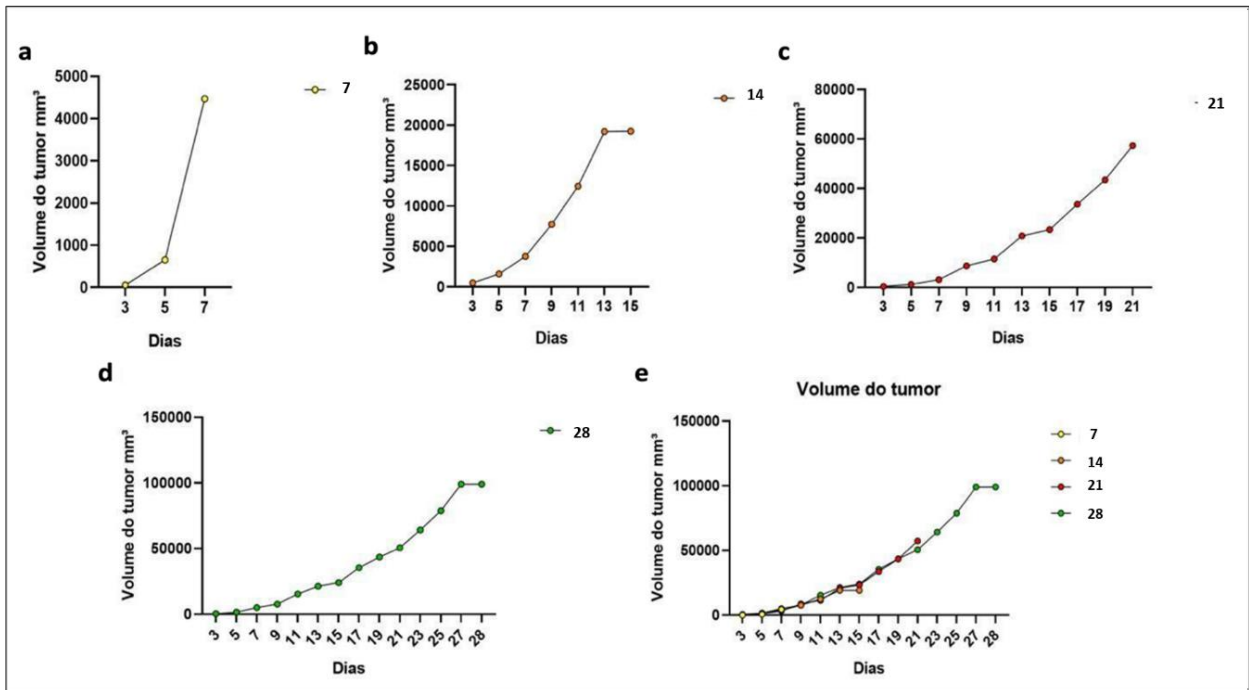


Figura 4 - Volume do tumor no período de 28 dias do 1º experimento. **a.** Medição do volume do tumor no grupo de 07 dias de acompanhamento. **b.** Medição do volume do tumor no grupo de 14 dias de acompanhamento. **c.** Medição do volume do tumor no grupo de 21 dias de acompanhamento. **d.** Medição do volume do tumor no grupo de 28 dias de acompanhamento. **e.** Sobreposição das curvas de crescimento nos grupos de 7, 14, 21 e 28 dias de acompanhamento. **Fonte:** Autora

No dia de eutanásia de cada grupo avaliado, foi medido o peso do tumor desses animais para uma análise comparativa entre os grupos avaliados. Observou-se um crescente aumento do peso do tumor ao longo do experimento, sendo maior no grupo de 28 dias (grupoverde), como demonstrado na figura 05.

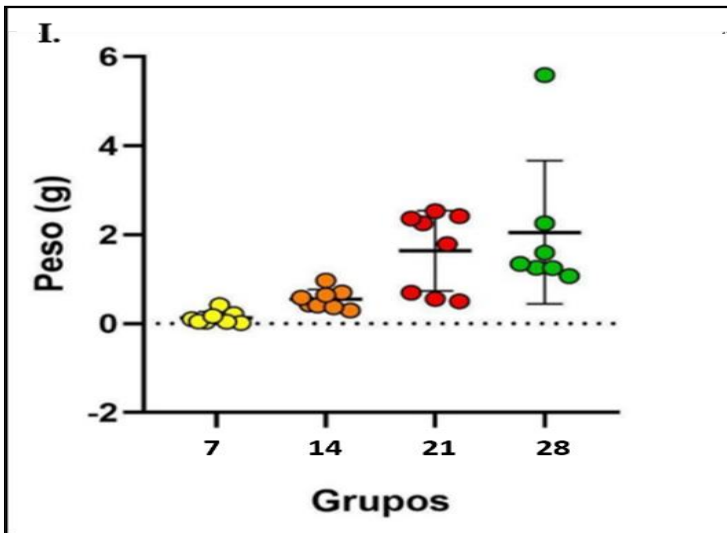


Figura 5 - Peso dos tumores nos grupos de 7, grupo 14, grupo 21 e grupo 28 de acompanhamento após inoculação de células tumorais murinas 4T1 no experimento.

Fonte: Autora

5.2 Análise histopatológica

As análises foram realizadas no sítio primário e no sítio metastático pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E) onde foi feita a quantificação da necrose, ulceração, metástase em linfonodo e em pulmão.

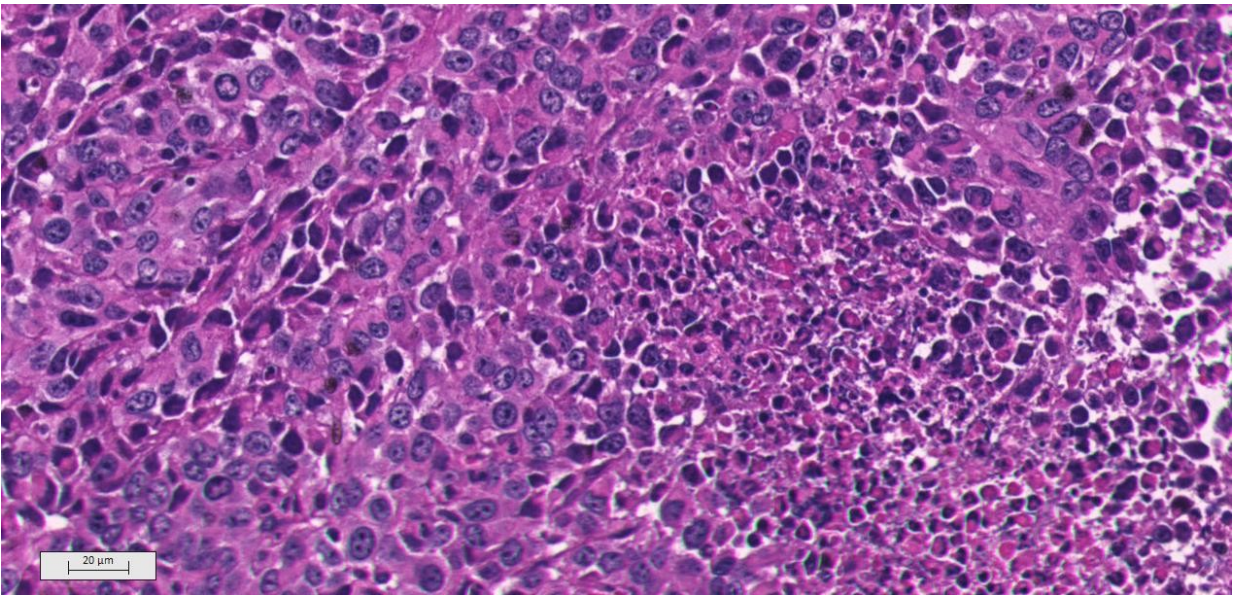


Figura 6 - Fotomicrografia no aumento de 20x de tumor no grupo de 28 dias na coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Fonte: Autora

Foi observado macroscopicamente que, durante o experimento, a maioria dos camundongos já apresentaram ulceração no tecido cutâneo aos 14 dias de experimento. Nas análises histopatológicas e macroscópicas, 23 camundongos apresentaram necrose tumoral aos 14, 21 e 28 dias, 10 apresentaram metástase pulmonar, sendo observados em 4 dos 8 animais avaliados aos 21 dias. Dos animais em que foi possível coletar os linfonodos inguinais, 9 apresentaram metástase. Ao analisar o parênquima pulmonar, foi observado focos metastáticos nos grupos de 21 e 28 dias (figura 07). No último grupo, um camundongoveio a óbito antes de ser realizado a eutanásia. Não foram colhidas amostras dos órgãos, tumor e sangue periférico deste animal.

Os demais órgãos (baço, rins, fígado e coração) foram analisados microscopicamente na coloração de HE e apresentaram-se morfológicamente normais sem alterações.

Tabela 4 - Avaliação de presença de necrose, ulceração e metástase nos camundongos aos 7, 14, 21 e 28 dias de acompanhamento do experimento.

	7 dias (n/total)	14 dias (n/total)	21 dias (n/total)	28 dias (n/total)
Necrose	0/8	8/8	8/8	7/8
Ulceração	0/8	5/8	8/8	8/8
Metástase em linfonodo	0/7	0/6	7/7	2/2
Metástase pulmonar	0/8	0/8	4/8	6/8

n=número

Fonte: Autora

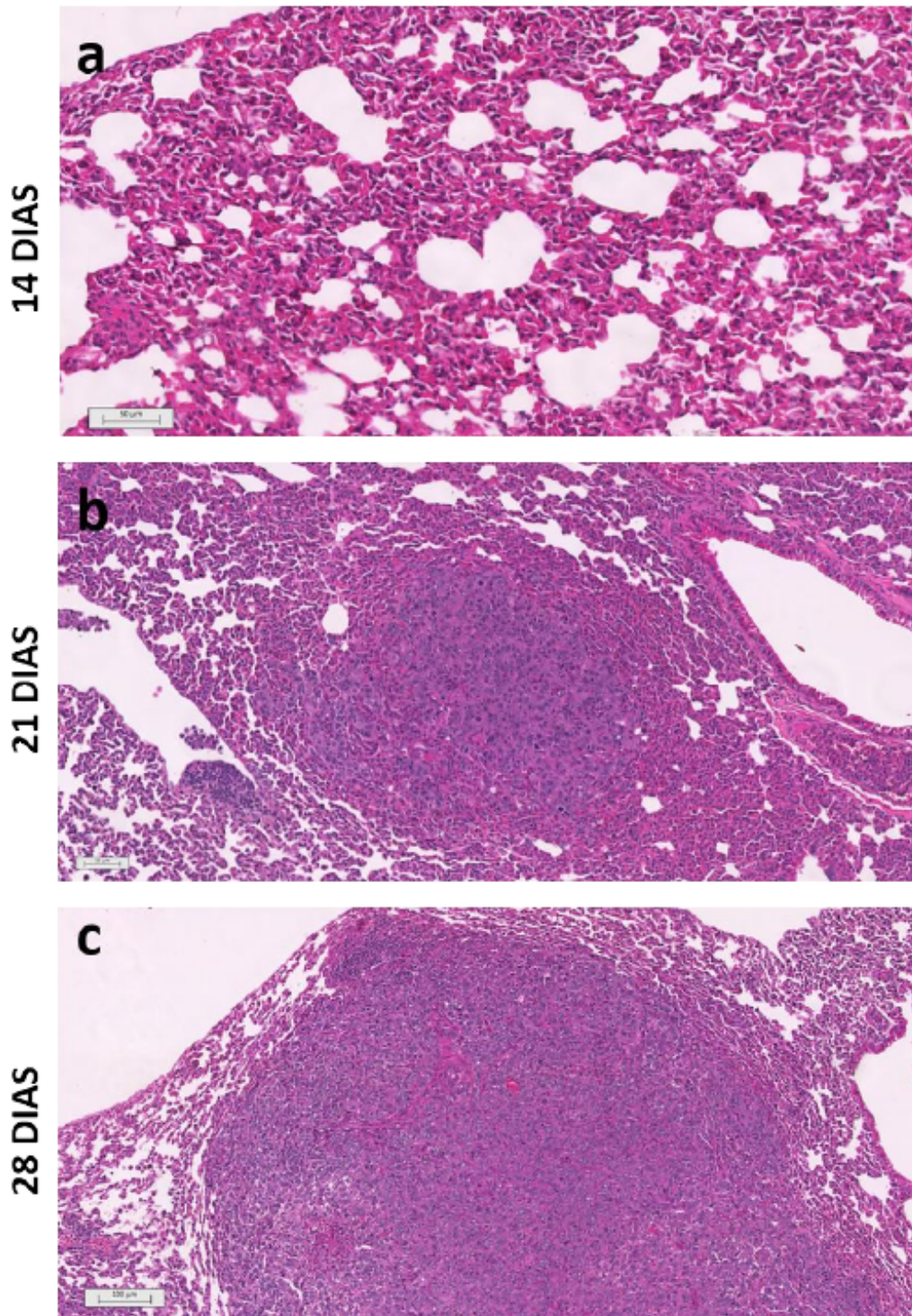


Figura 7 - Parênquima pulmonar de camundongos BALB/c inoculados com o tumor 4T1 e eutanasiados ao 14^o, 21^o e 28^o dia de inoculação tumoral. **a.** Pulmão sem metástase e presença de células inflamatórias no interstício (400x). **b.** Pequena área de metástase pulmonar no grupo de 21 dias (100x). **c.** Extensa área de metástase pulmonar no grupo de 28 dias (100x). Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Fonte: Autora

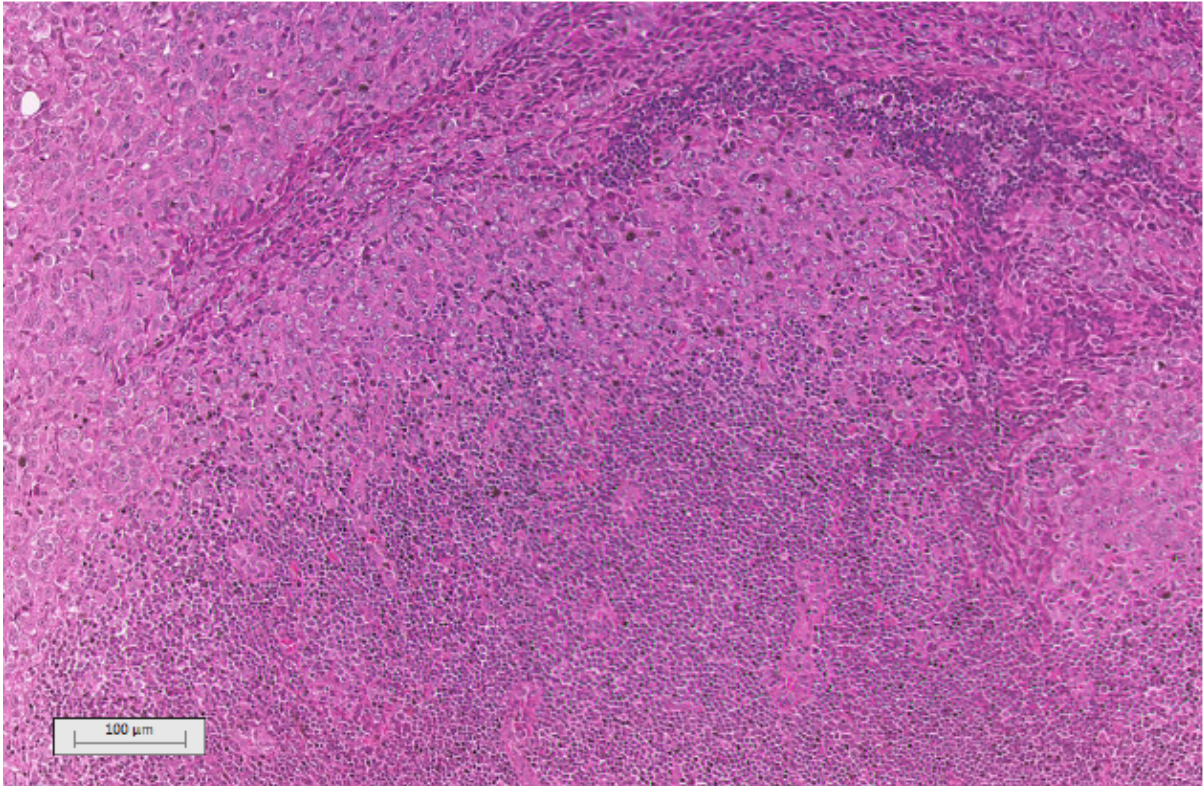


Figura 8 - Linfonodo de camundongo de 21 dias com área de metástase de carcinoma mamário 4T1 (100x). Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

Fonte: Autora

5.3 Caracterização morfológica de colágeno na matriz extracelular tumoral

A caracterização morfológica de colágeno na MEC foi feita através das colorações especiais Tricromico de Masson (coloração azulada) e Picrosirius Red (coloração esverdeada-avermelhada) (figura 08). Os padrões das fibras de colágeno foram analisados nas áreas adjacentes a proliferação epitelial dos tecidos tumorais de cada caso.

O Tricromico de Masson (TM) possibilita a análise da quantidade, distribuição e organização do colágeno e de alguns componentes da matriz extracelular. Já o Picrosirius (PS) desempenha um papel crucial para identificação de colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde).

As análises dessas colorações foram realizadas em fotomicrografias capturadas em 10 campos histológicos, na objetiva de 40x. Os pixels azuis (TM), verde ou vermelho (PS) foram quantificados pelo 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. A análise das amostras tumorais em Tricromico de Masson revelaram os valores de média semelhantes de deposição de colágeno aos 14, 21 e 28 dias (Tabela 05) no tumor.

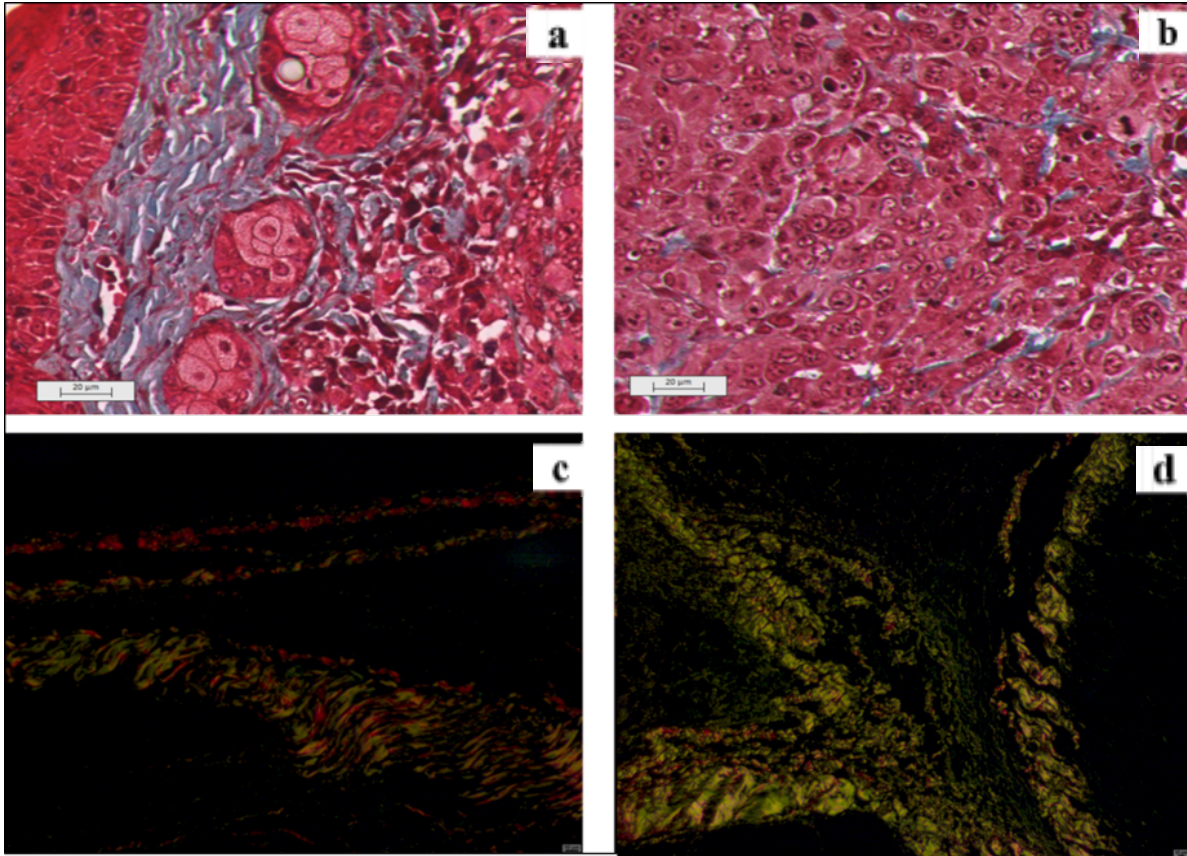


Figura 9 - Coloração em Tricrômico de Masson revelando deposição de colágeno no estroma peritumoral (a) e nas células tumorais (b) no aumento de 400x. Barra 20 µm. Coloração em Picrosirius Red revelando deposição de colágeno tipo I (em vermelho) e tipo III (em verde) no estroma peritumoral (c e d) no aumento de 200x.

Fonte: Autora

Tabela 5 - Caracterização das fibras de colágeno na coloração de TM e PS.

	Tricromico de Masson			Picrosíríus – Colágeno I			Picrosirius – ColágenoIII		
	<i>14 d</i>	<i>21 d</i>	<i>28 d</i>	<i>14 d</i>	<i>21 d</i>	<i>28 d</i>	<i>14 d</i>	<i>21 d</i>	<i>28 d</i>
Tumor									
Media	9.703	8.222	10.007	4.130	14.395	20.162	15.955	20.048	21.711
Desvio	2.362	5.155	4.533	4.206	6.593	13.379	11.968	17.810	12.196
Padrão									

Fonte: Autora

5.4 Expressão de versican, versikina, ADAMTS1, 5 e 15 em estroma peritumoral e células murinas 4T1

5.4.1 Análise da expressão de Versican (VCAN) em estroma e células neoplásicas

Nesta análise, observou-se uma maior expressão de VCAN no estroma peritumoral nos grupos de 21 e 28 dias quando comparado aos tumores avaliados no grupo de 14 dias ($p=0,0119$ e $p=0,0257$, respectivamente). Quando a expressão foi avaliada em células tumorais 4T1, observou uma maior expressão de VCAN no grupo de 28 dias quando comparado ao grupo de 14 dias ($p=0,0042$).

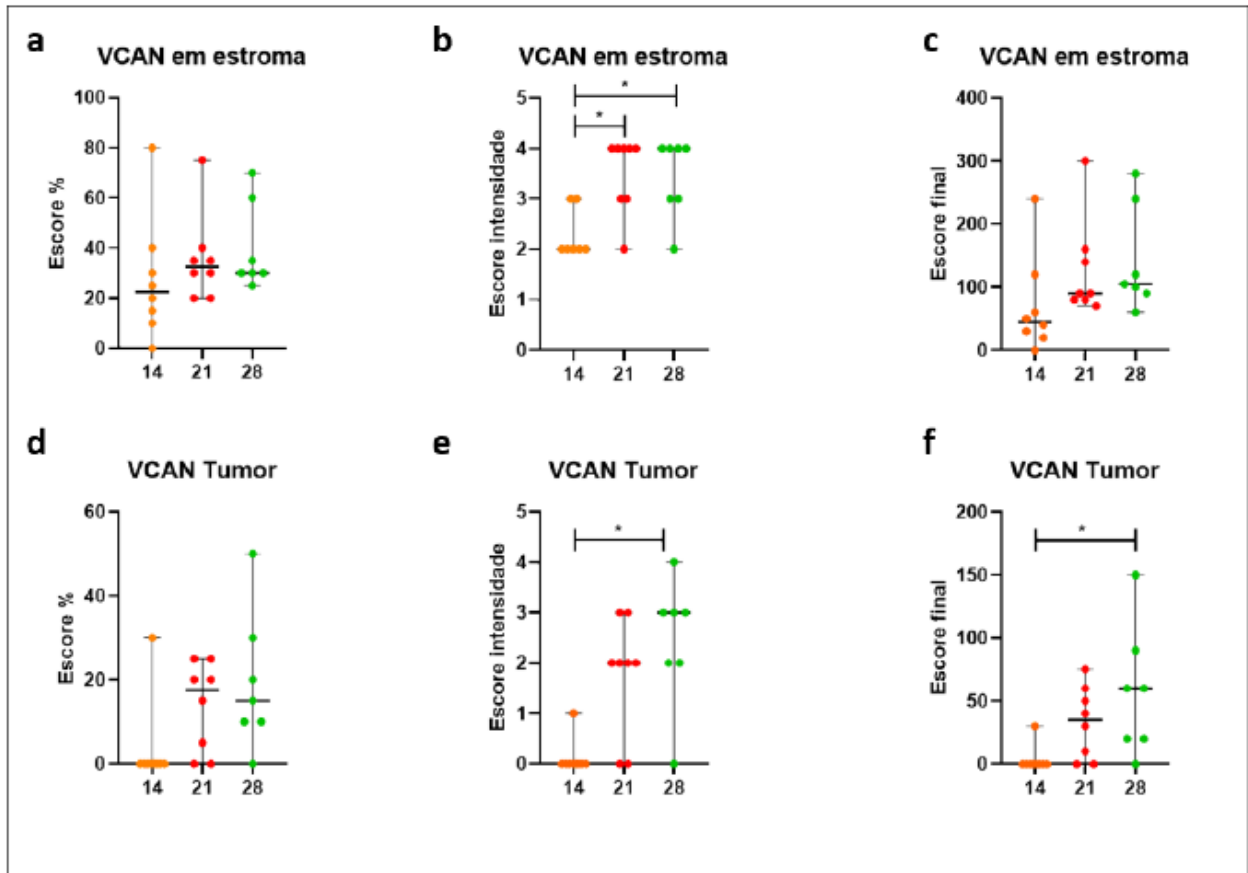


Figura 10 - Expressão de VCAN no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escores de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escores de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Fonte: Autora

Em relação ao escore final nas células tumorais 4T1 (Figura 11F), observou uma maior expressão de VCAN no grupo de 28 dias quando comparado ao grupo de 14 dias ($p=0,0323$). A

imunomarcção de VCAN em estroma peritumoral e em células neoplásicas poder ser observada na Figura 16.

5.4.2 Análise da expressão de Versikina (VKINA) em estroma e células neoplásicas

Ao analisar o proteólito versikina, foi observado um maior número de casos com intensidade 3 e 4 nos grupos de 21 e 28 dias no estroma peritumoral, contudo foi observada uma diferença estatística significativa (Figura 12 b). Acerca do escore final, há uma maior expressão estromal de VKINA no grupo de 21 dias em comparação com o grupo de 14 dias ($p=0,0193$). A imunomarcção de VKINA em estroma peritumoral e em células neoplásicas pode ser observada na Figura 16.

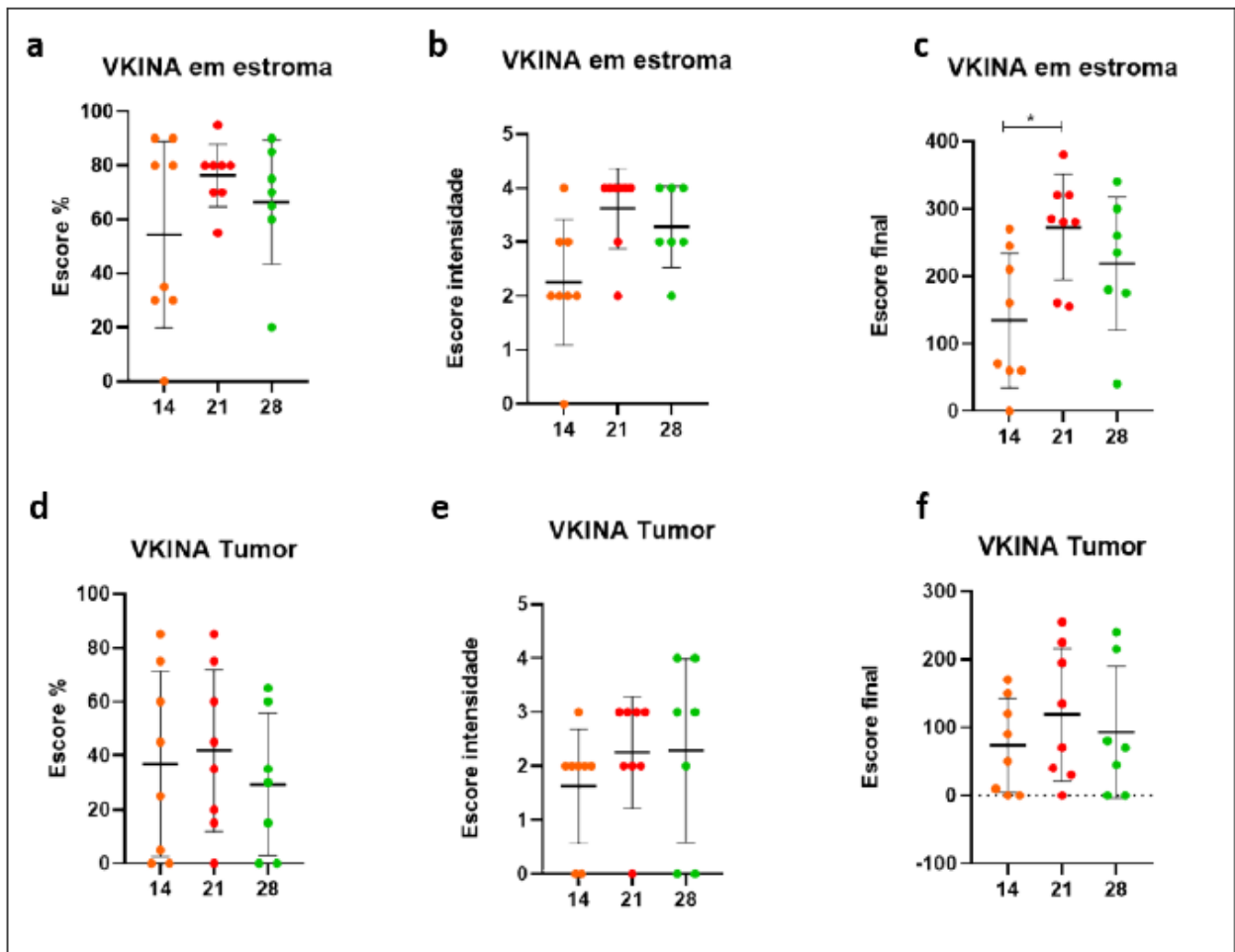


Figura 11 - Expressão de VKINA no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Fonte: Autora

5.4.3 Análise da expressão de ADAMTS1 em estroma e células neoplásicas

Ao analisar a versicanase ADAMTS1, observou-se uma maior porcentagem de expressão no estroma nos grupos de 21 e 28 comparando ao grupo de 14 dias (Figura 13a) ($p=0,0320$ e $p=0,0350$, respectivamente). Além disso, a intensidade de marcação revelou-se mais forte nos grupos de 21 e 28 dias quando comparado ao grupo de 14 ($p=0,0179$). Em relação ao escore final de expressão no estroma (figura 13c) foi verificado uma maior expressão de ADAMTS1 nos grupos de 21 e 28 dias em relação ao grupo de 14 dias ($p=0,0046$ e $p=0,0048$ respectivamente). A imunomarcação de ADAMTS1 em estromaperitumoral e em células neoplásicas pode ser observada na Figura 16.

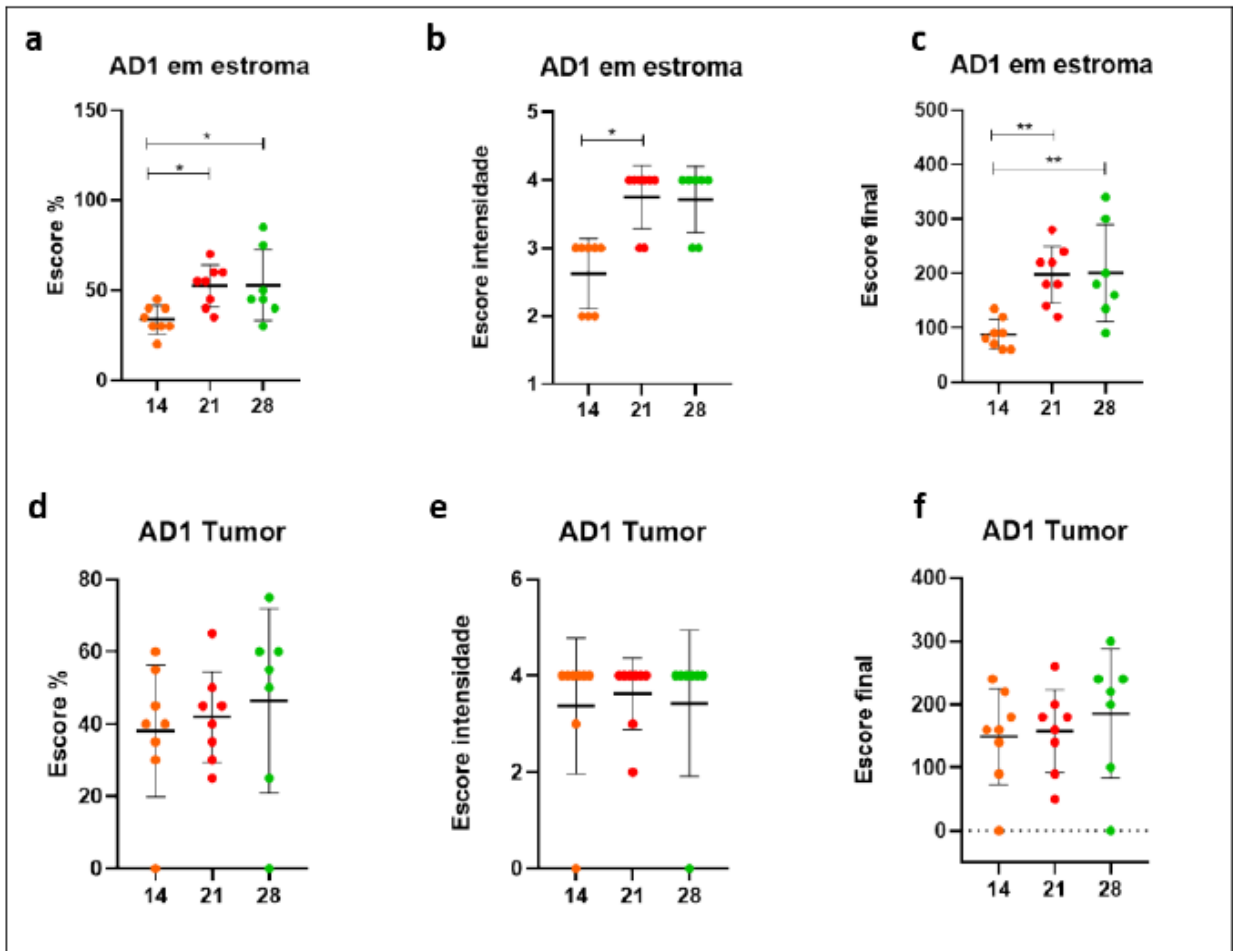


Figura 12 - Expressão de ADAMTS1 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Fonte: Autora

5.4.4 Análise da expressão de ADAMTS5 em estroma e células neoplásicas

Não foram observadas diferenças na expressão estromal e tumoral de ADAMTS5 em amostras de tumores primários de animais inoculados com as células 4T1 e eutanasiados no 14º, 21º, e 28º dia de crescimento tumoral. A imunomarcação de ADAMTS5 em estroma peritumoral e em células neoplásicas pode ser observada na Figura 16.

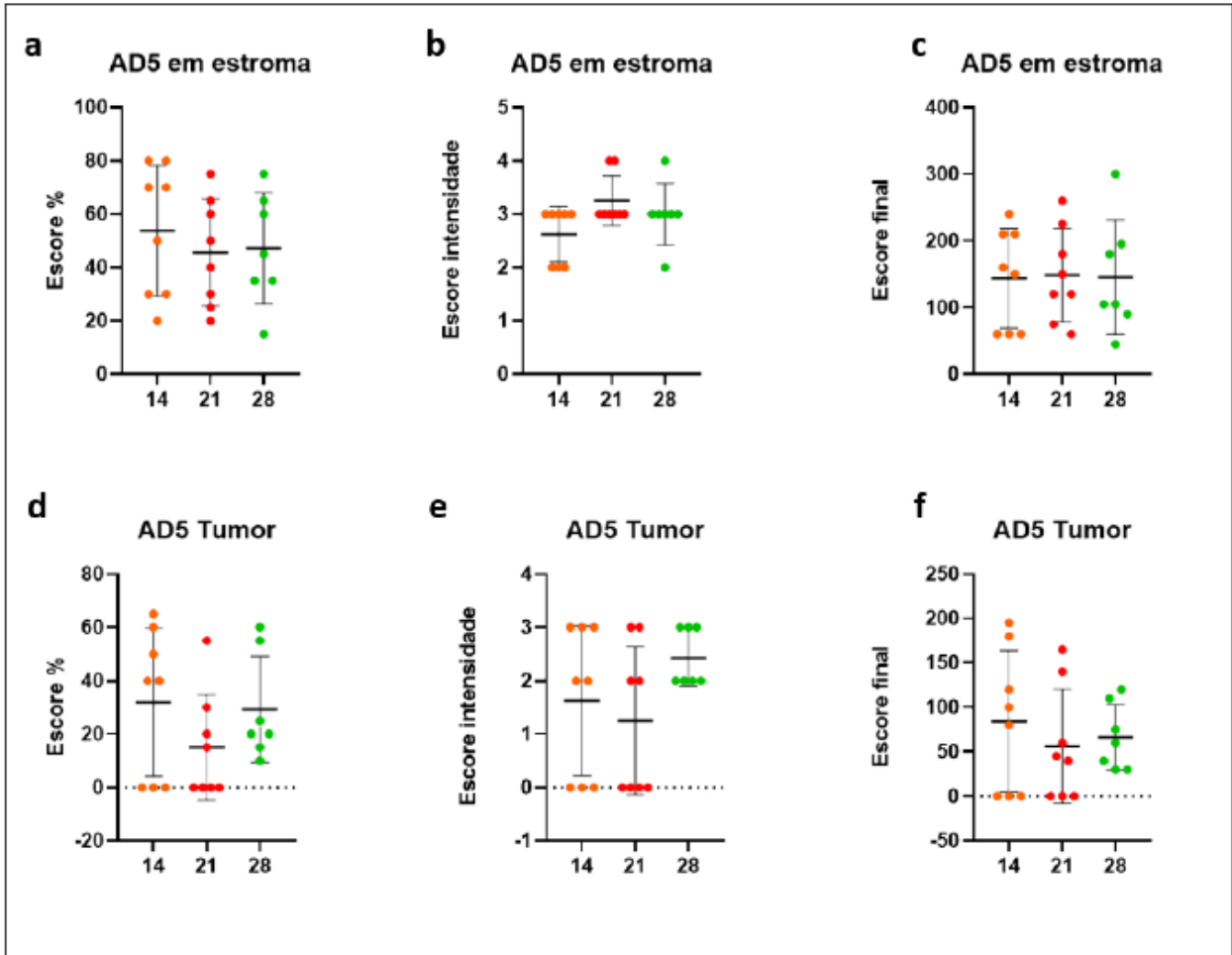


Figura 13 - Expressão de ADAMTS5 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Fonte: Autora

5.4.5 Análise da expressão de ADAMTS15 em estroma e células neoplásicas

Foi observada uma redução da porcentagem de expressão (Figura 15a), intensidade (Figura 15b) e escore final (Figura 15c) da ADAMTS15 no 28° dia em relação ao 21° dia de inoculação tumoral ($p=0,0081$, $p=0,0169$, $p=0,0219$, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quanto a expressão em células neoplásicas. A imunomarcção desta enzima em estroma peritumoral e em células neoplásicas pode ser observada na Figura 16.

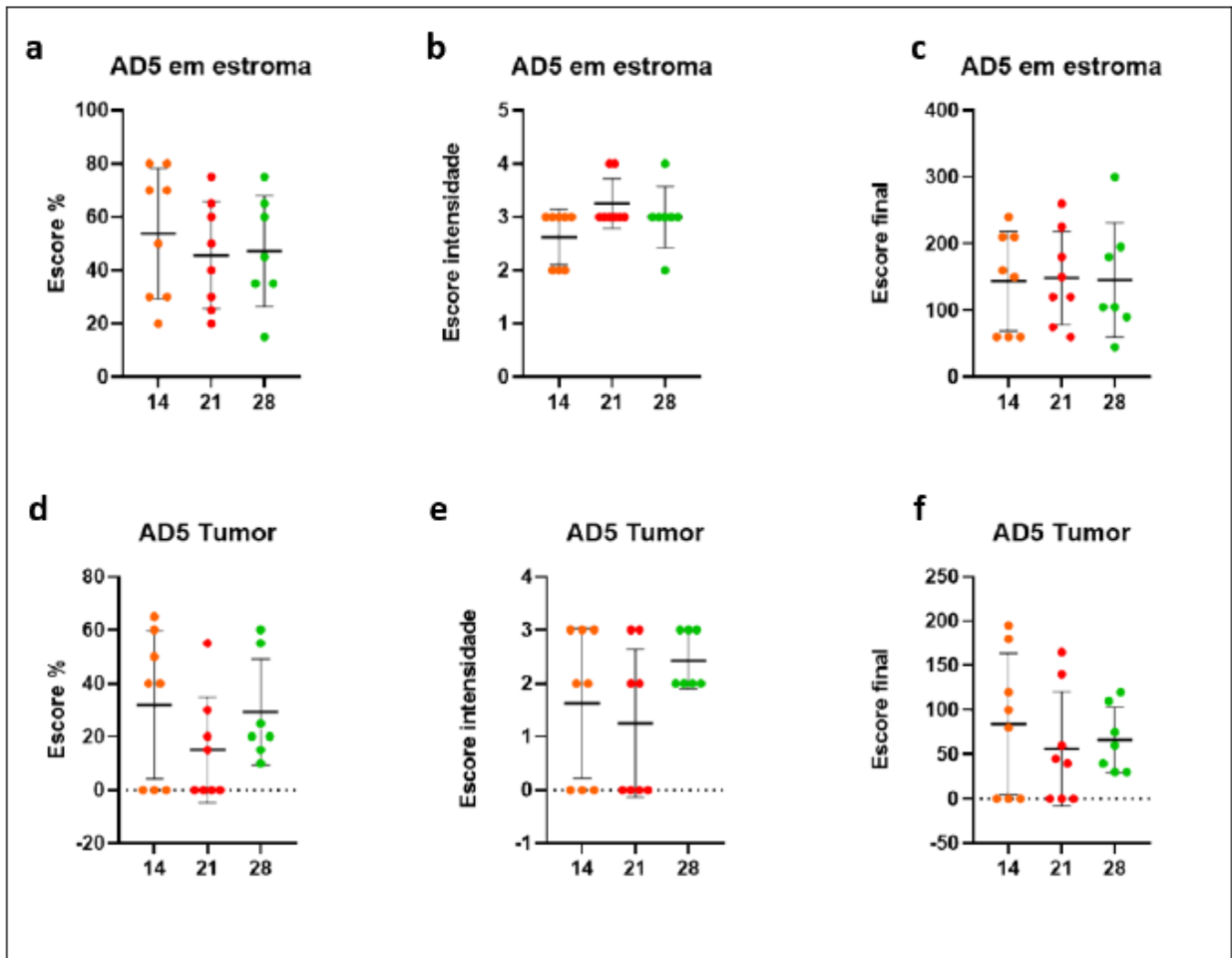


Figura 14 - Expressão de ADAMTS15 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escore de percentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escore de percentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Fonte: Autora

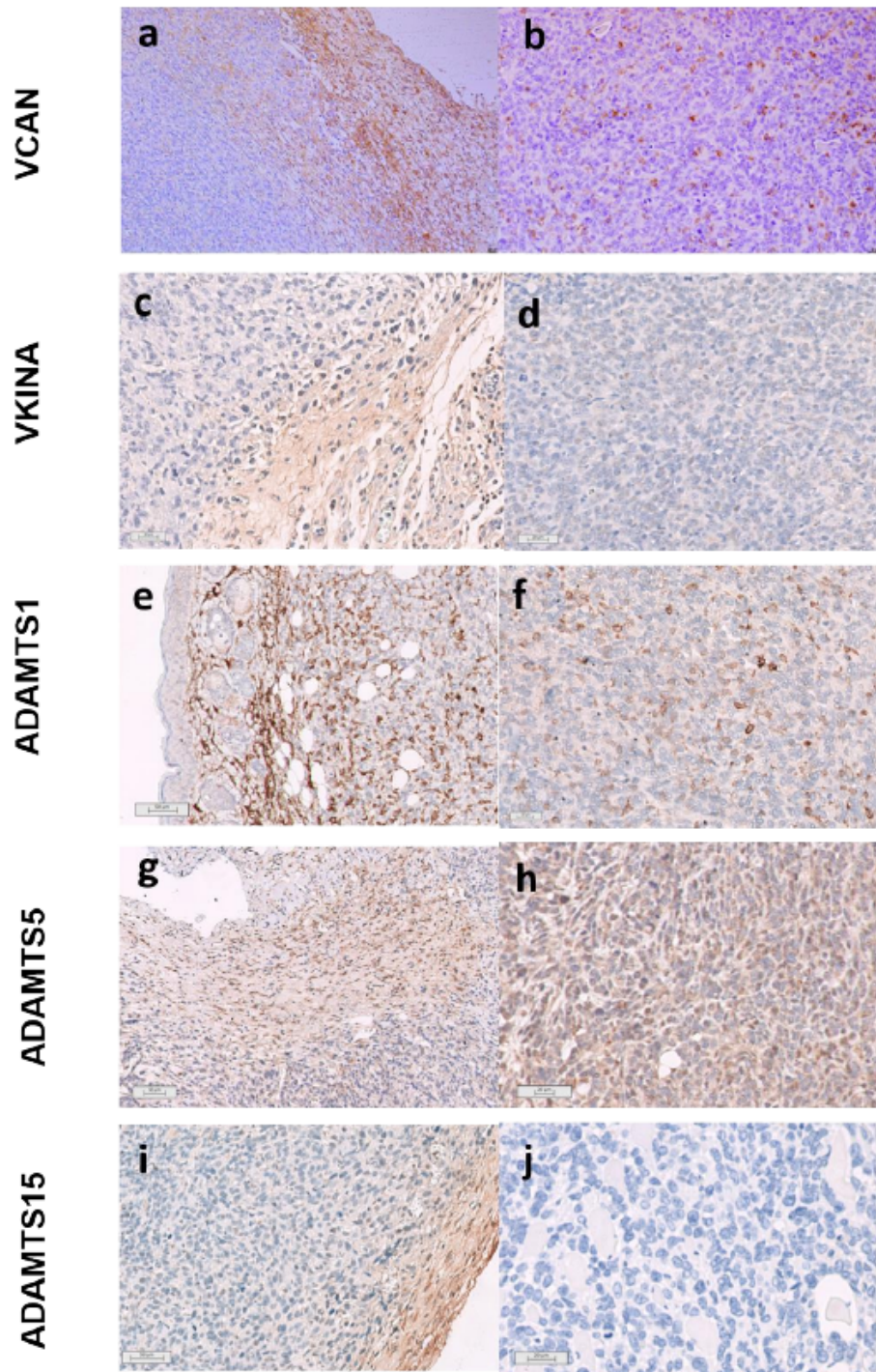


Figura 15 - Expressões de VCAN, VKINA e as enzimas ADAMTS1, 5 E 15 em tumor primário 4T1. **a.** Expressão forte de VCAN no estroma tumoral em 14 dias. 100x **b.** Expressão forte de VCAN no estroma tumoral e nas células tumorais em 21 dias. 200x. **c.** Expressão moderada de VKINA no estroma em 28 dias. 200x. **d.** Expressão fraca de VKINA nas células tumorais em 21 dias. 400x. **e.** Expressão forte de ADAMTS1 no estroma em 21 dias. 200x. **f.** Expressão forte de ADAMTS1 nas células tumorais em 28 dias. 400x. **g.** Expressão moderada de ADAMTS5 no estroma em 14 dias. 100x. **h.** Expressão forte de ADAMTS5 nas células tumorais em 21 dias. 400x. **i.** Expressão moderada de ADAMTS15 no estroma em 21 dias. 200x. **j.** Expressão negativa de ADAMTS15 nas células tumorais em 21 dias. 400x. a-j Contra-coloração de hematoxilina de mayer's e marcação com DAB.

Fonte: Autora

5.4.6 Correlação entre colágeno e expressão de VCAN e ADAMTS

Na análise da coloração de Tricrômico de Masson, foi observada correlação negativa entre colágeno e expressão de ADAMTS5 ($p=0,0131$ e $r=-0,85$) no grupo de 14 dias, bem como com expressão de VCAN ($p=0,0246$ e $r=-0,85$) e ADAMTS15 ($p=0,0333$ e $r=-0,92$) em células tumorais no grupo de 28 dias.

Na coloração de Picrossirius, os dois tipos de colágeno (I e III) presentes na matriz extracelular apresentaram um aumento gradativo ao longo da progressão do tumor primário (Tabela 04), contudo não houve diferença significativa. Foi observada correlação inversa entre a disposição de colágeno tipo III revelou correlação inversa com expressão de VCAN em estroma ($p=0,0008$ e $r=-0,99$) e correlação positiva com expressão de ADAMTS5 ($p=0,0444$ e $r=0,84$) no grupo de 28 dias.

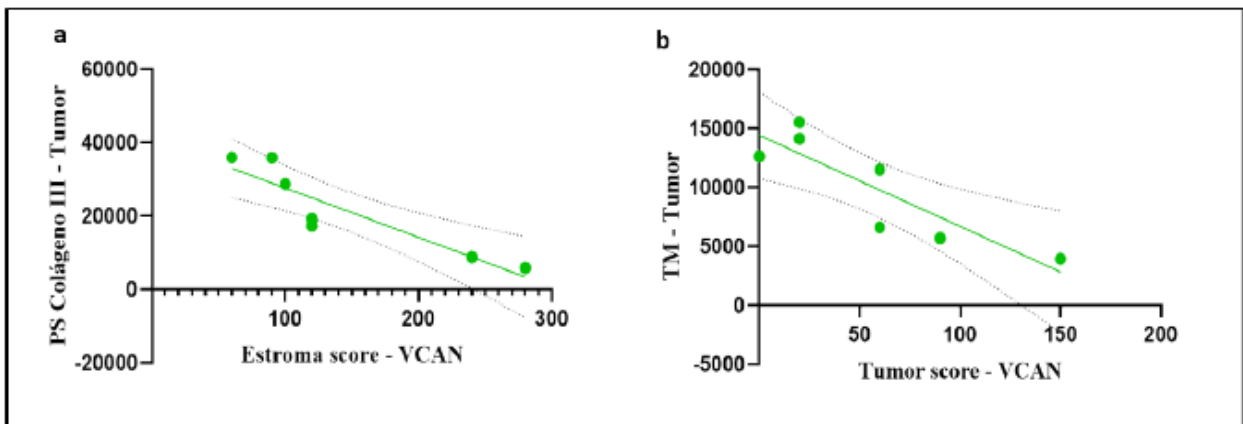


Figura 16 - Correlação de deposição de colágeno na matriz extracelular, corado em Picrossirius e Tricrômico de Masson, e expressão de VCAN no grupo de 28 dias em estroma (a) e em células tumorais ($p=0,0008$ e $r=-0,99$) (b). Curva de regressão linear simples ($p=0,0246$ e $r=-0,85$).

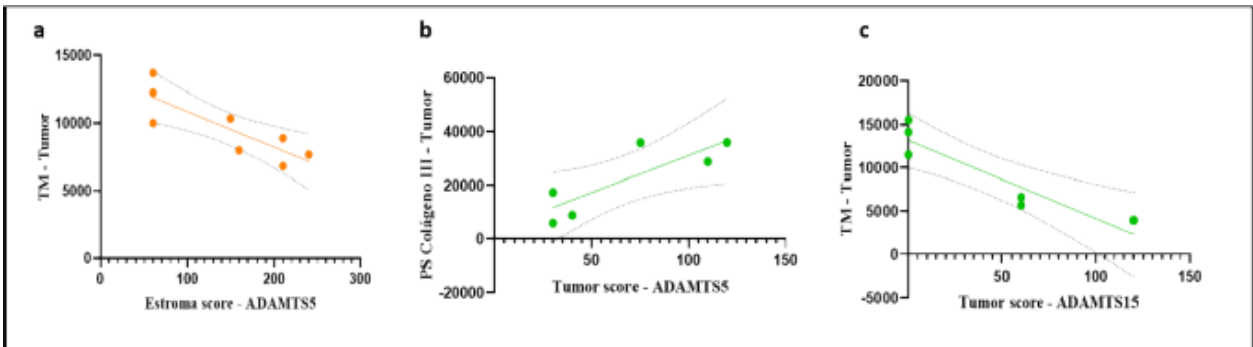


Figura 17 - Correlação de deposição de colágeno na matriz extracelular, corado em Tricrômico de Masson, e expressão de ADAMTS5 no grupo de 14 dias ($p=0,0131$ e $r=-0,85$) (a), ADAMTS5, corado em Picrossirius, no grupo de 28 dias ($p=0,0444$ e $r=0,84$) (b) e ADAMTS15 no grupo de 28 dias (c) avaliados em células tumorais ($p=0,0333$ e $r=-0,92$). Curva de regressão linear simples.

5.5 Expressão de versican, versikina, ADAMTS1, 5 e 15 no parênquimapulmonar

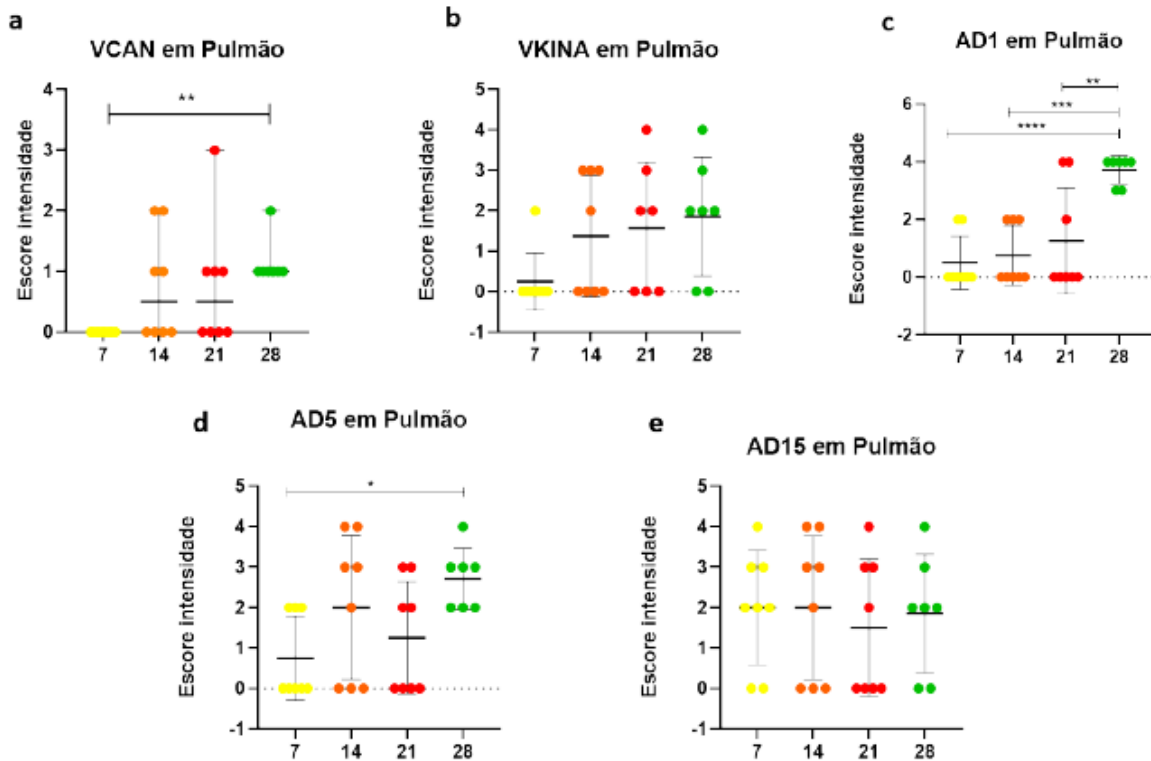


Figura 18 - Expressão de (a) VCAN, (b) VKINA, (c) ADAMTS1, (d) ADAMTS5 e (e) ADAMTS15 em parênquima pulmonar nos grupos de 7, 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Fonte: Autora

Foi avaliado a intensidade de expressão de VCAN (Figura 18), VKINA, ADAMTS1, 5 e 15 em amostras de pulmão sem nódulos metastáticos ou em áreas peritumorais, quando houve focos evidentes de metástases. Todos os animais apresentaram expressão de VCAN no parênquima pulmonar após o 28º dia de inoculação tumoral, enquanto no 7º dia nenhum animal apresentou expressão de VCAN (Figura 17a). Foi observado uma maior expressão de VCAN nos estágios finais de inoculação tumoral quando comparado aos estágios iniciais (Figura 17a).

Quanto a expressão da versicanase ADAMTS1, foi observada maior expressão desta nos pulmões de animais do grupo de 28 dias quando comparado ao grupo de 7 dias ($p < 0,0001$), 14 dias ($p = 0,0003$) e 21 dias ($p = 0,0024$). Ademais, foi observado um aumento da expressão de ADAMTS5 quando comparado ao grupo de 7 dias ($p = 0,0352$) (Figura 17d).

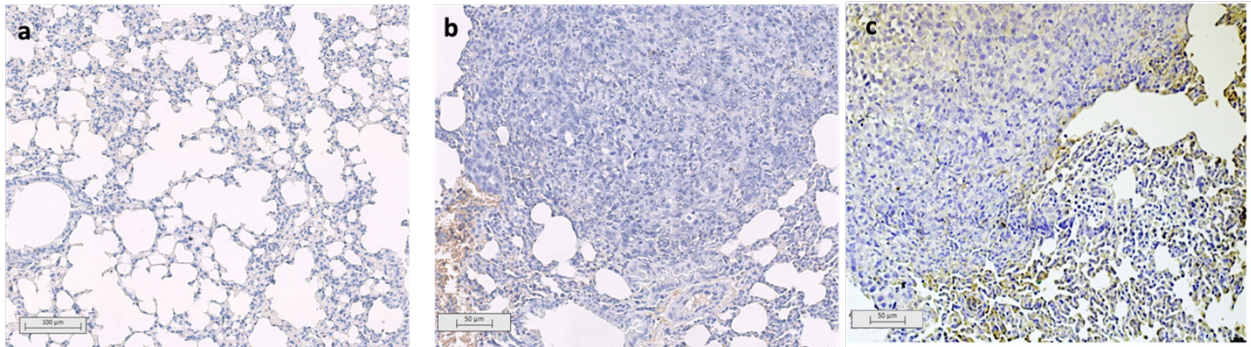


Figura 19 - Expressão de VCAN em parênquima pulmonar de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1. A. Expressão negativa em parênquima pulmonar aos 7 dias. 100x. B. Expressão negativa em foco metastático e fraca em parênquima pulmonar aos 14 dias como foco metastático. 200x. C. Expressão fraca em parênquima pulmonar aos 21 dias com foco metastático. 200x.

Fonte: Autora

5.6 Caracterização fenotípica de infiltrado inflamatório tumoral e sua relação com a proteólise de VCAN e seu proteólito

5.6.1 Endereçamento de linfócitos e células de origem mielóide para o sítio tumoral

Durante a avaliação fenotípica das células T no sangue periférico foi observado na segunda semana e terceira semana de inoculação tumoral maior frequência de células T CD4⁺ quando comparada com a frequência de células T CD8⁺, seguida de uma redução na quarta semana, onde há um aumento da frequência de células T CD8⁺ (Figura 19a). Ao avaliarmos a expressão da molécula de endereçamento leucocitário ICAM (CD54⁺) e L-selectina (CD62L⁺) nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ circulantes, observou-se uma redução do número dessas na segunda semana de inoculação tumoral seguida de um aumento expressivo na terceira e quarta semana de inoculação tumoral, indicando maior adesão linfocítica (rolagem das células sobre a superfície endotelial), migração transendotelial, ativação e provável resposta imune efetora.

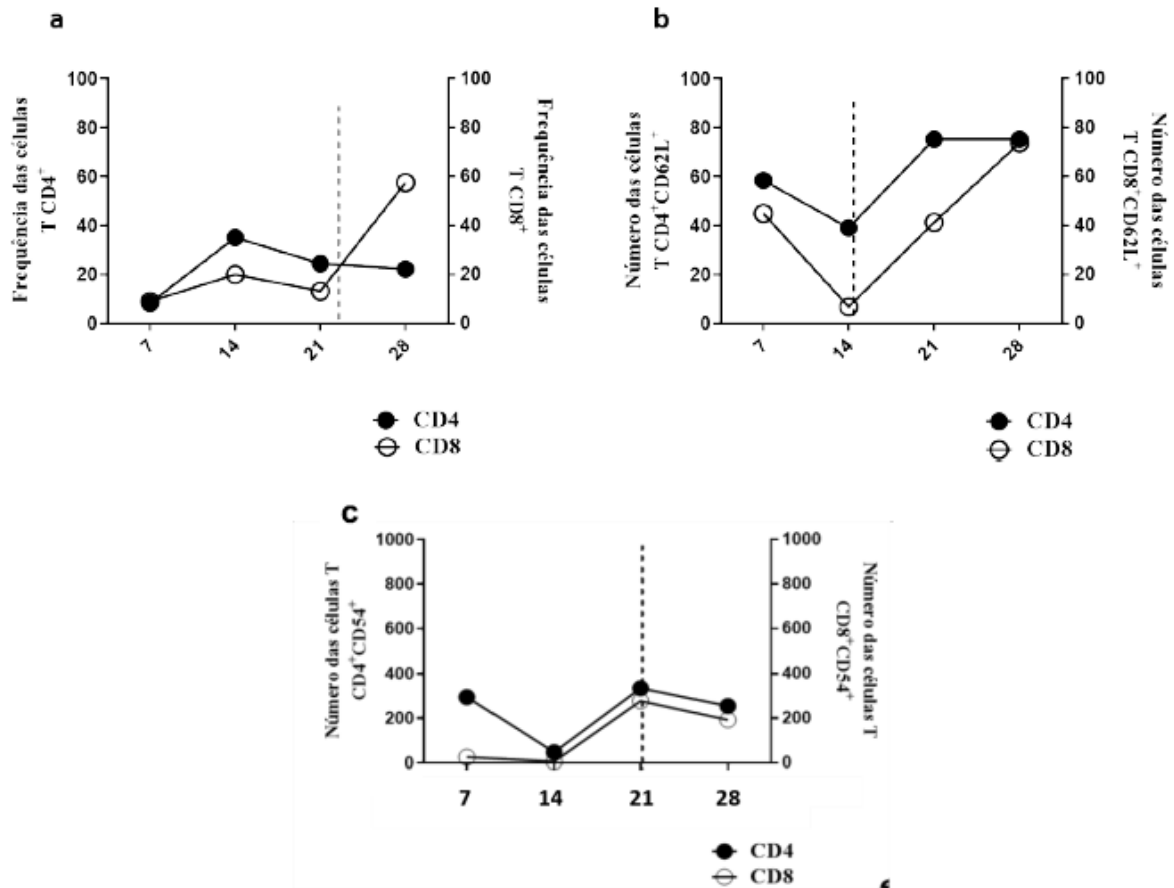


Figura 20 - Frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias (a), número de células T CD4⁺CD62L⁺ e T CD8⁺CD62L⁺ no sangue periférico de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias (b) e número de células T CD4⁺CD54⁺ e T CD8⁺CD54⁺ no sangue periférico de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias (c).

Fonte: Autora

Observou-se no infiltrado tumoral, nas três primeiras semanas, uma maior frequência de células T CD4⁺ comparado com a frequência de células T CD8⁺ e uma inversão dessas frequências na transição da terceira semana para a quarta, onde há um aumento da frequência das células T CD8⁺ e uma diminuição da frequência de células T CD4⁺ (Figura 20), semelhante ao que foi observado no sangue periférico.

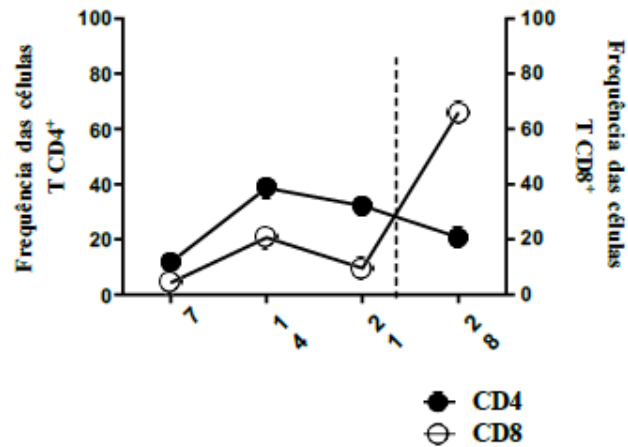


Figura 21 - Frequência de células T CD4+ e T CD8+ no infiltrado tumoral de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias.

Fonte: Autora

Ao avaliarmos o número das células de origem mieloide em amostras de tumor primário 4T1, foi observado um maior número de células CD11b⁺ nos tempos tardios de inoculação tumoral, com pico dessas células na terceira semana, seguida de um leve declínio na quarta semana (Figura 21^a). Esse resultado foi corroborado pelo maior número de células CD11b⁺CD106⁺ (VCAM) em amostras tumorais aos 21 e 28 dias, o que indica um aumento da migração destas células para o sítio tumoral nas últimas semanas de experimento.

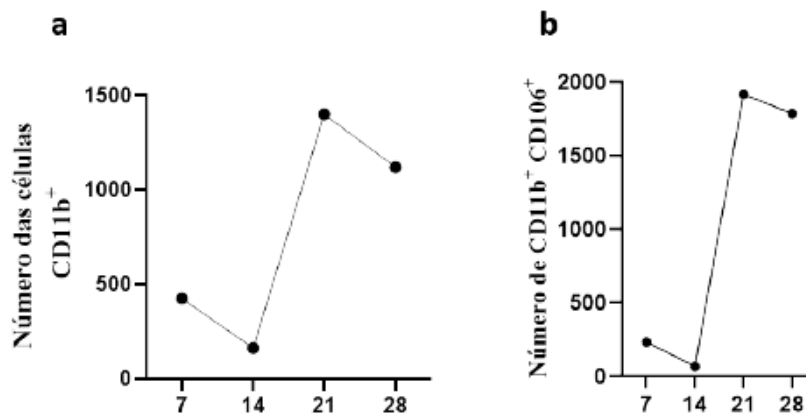


Figura 22 - Número de células CD11b⁺ no infiltrado tumoral de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias (a) e Número de células CD11b⁺CD106⁺ no infiltrado tumoral de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1 após 7, 14, 21 e 28 dias.

Fonte: Autora

5.6.2 Resposta imune linfocítica e relação com expressão de VCAN em tumor 4T1

Para caracterizar o perfil de ativação e função de LT CD4 e CD8 no microambiente tumoral do tumor 4T1, foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α e anti-inflamatória IL-10, bem como marcador de célula regulatória FoxP3. O perfil de LT CD8⁺ também foi avaliado quanto a sua ação citotóxica através da marcação de perforina. As duas primeiras semanas de crescimento tumoral foram caracterizadas por infiltrado tumoral predominantemente pró-inflamatório, enquanto as duas últimas semanas foram caracterizadas pela expressão de citocinas anti-inflamatórias. Apesar de haver um crescimento do número de linfócitos T CD8⁺ da terceira para quarta semana, também foi observado um pico de expressão de FoxP3 na terceira semana de crescimento tumoral, sugerindo um papel regulatório dessas células T CD8⁺. A caracterização os perfis de linfócitos podem ser observados nos gráficos apresentados na figura 22.

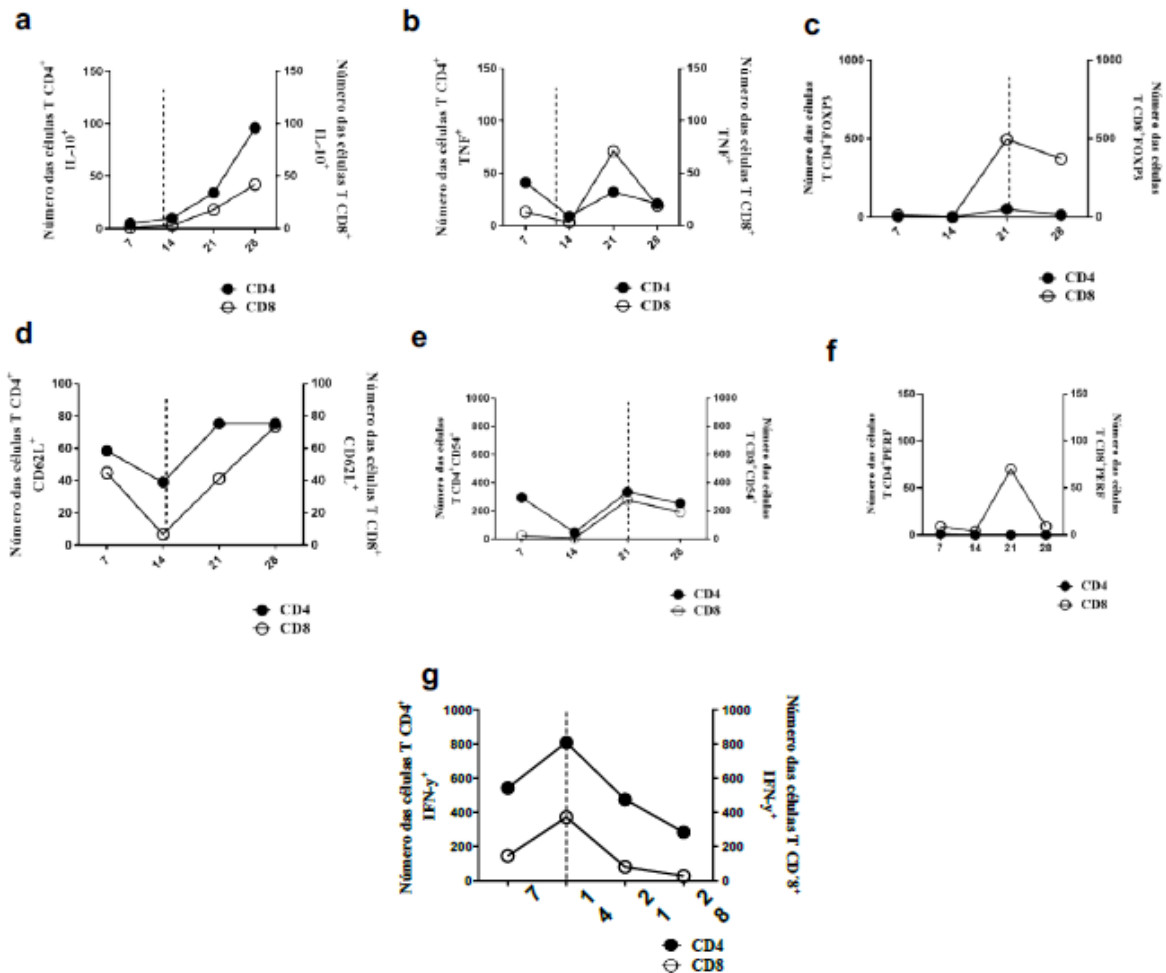


Figura 23 - Caracterização dos perfis de linfócitos no sangue periférico das moléculas IL-10 (a), TNF (b), FOXP3 (c), CD62L (d), CD54 (e), PERF (f) e IFN (g).

Fonte: Autora

A presença de VCAN em estroma intratumoral apresentou relação com perfil de LT CD4⁺CD62L⁺ ($p=0,0333$ e $r=0,97$), assim como com o infiltrado LT CD4⁺IFN- γ ⁺ ($p=0,0167$ e $r=1,0$) em sangue periférico no grupo de 28 dias. O declínio da frequência de células T CD4⁺ no sangue periférico observado neste grupo sugere recrutamento de deste perfil celular para o sítio tumoral e relação do proteoglicano neste processo (gráfico 01a).

5.6.3 Perfil de células mielóides e relação com expressão de VCAN em tumor 4T1

Para caracterizar o perfil de ativação e função das células mielóides no tumor 4T1, foram avaliadas células $CD11b^+$, $CD16/32^+$, expressão de IL-2, IL-12, MHCII e Arginase. A caracterização dos perfis de células mielóides pode ser observada nos gráficos apresentados na Figura 23.

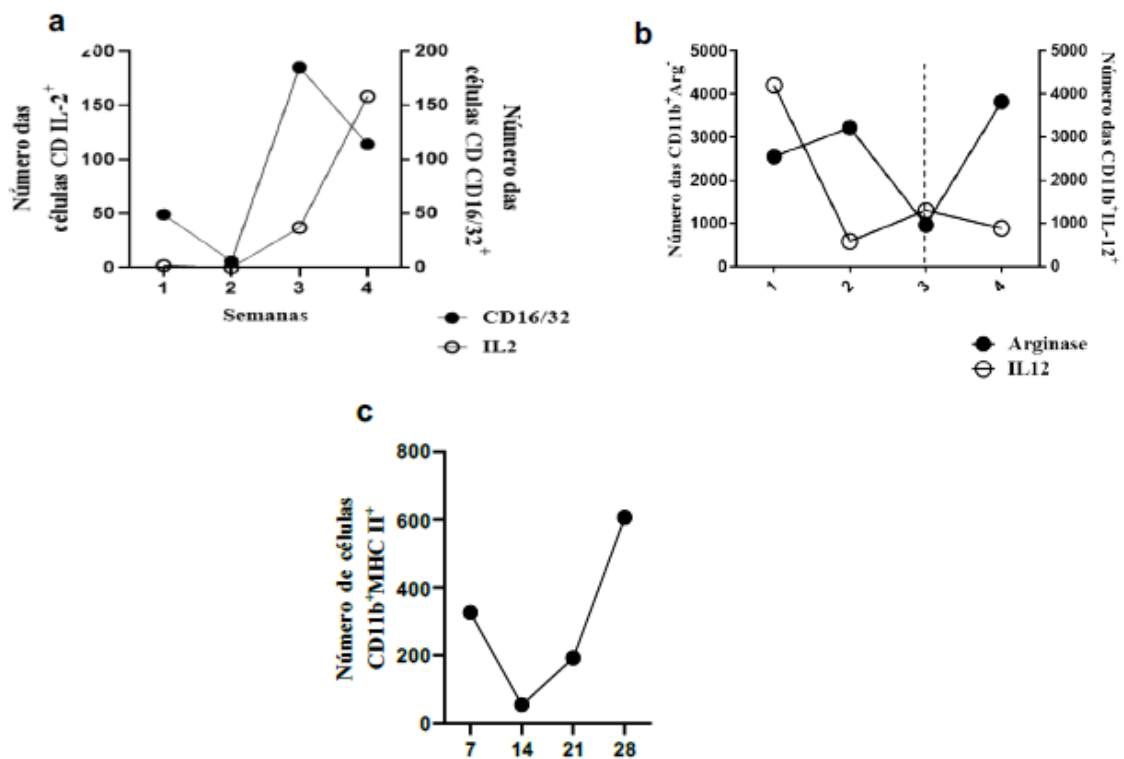


Figura 24 - Caracterização dos perfis das células mielóides no tumor das moléculas IL-2, CD16/32 (a), Arginase, IL-12 (b) e MHC II (c).

Fonte: Autora

Aos 14 e aos 28 dias de crescimento tumoral, a expressão de VCAN em células demonstrou uma relação positiva com infiltrado de células $CD11b^+ CD16/32^+$ ($p=0.0023$ e $r=0,81$) e ($p=0,0377$ e $r=0,75$), respectivamente. Vale ressaltar que este proteoglicano também apresentou correlação positiva com infiltrado de células $CD11b^+ IL-12^+$ aos 14 dias ($p=0.0134$ e $r=0.67$), indicando sua relação com resposta pró-inflamatória.

5.6.4 Relação de VKINA e infiltrado intratumoral de células mieloides em tumor 4T1

Ao avaliarmos o perfil do infiltrado de células mieloides foi observado que células CD11b⁺ CD16/32⁺ apresentaram correlação positiva com a expressão de matriquina em células tumorais na segunda semana de crescimento tumoral ($p=0,0127$ e $r=0,84$). Neste grupo de animais, também foi observada correlação positiva entre VKINA e células CD11b⁺IL-2⁺, sugerindo possível papel desta molécula na manutenção de microambiente anti-inflamatório. Na análise da correlação entre a proteólise de VCAN e perfil de linfócitos intratumorais, não foram observadas correlações significativas. Contudo, vale ressaltar, que entre os dias 14 e 21 de crescimento do tumor 4T1 ocorre a disseminação das metástases (PULASKI, 2001)

A correlação entre esta matriquina em estroma e a presença de células mieloides CD11b⁺ se manteve aos 28 dias ($p=0,0341$ e $r=0,082$), quando a mesma também apresentou relação com expressão de arginase nesta população ($p=0,0238$ e $r=0,86$), sugerindo um cenário anti-inflamatório, uma vez que esta enzima é secretada, especialmente, por macrófagos do tipo M2.

5.6.5 Relação entre ADAMTS 1, 5 e 15 e o infiltrado de células T e células mieloides em tumor 4T1

Aos 14 dias de crescimento tumoral, a expressão de ADAMTS1 em células e em estroma foi correlacionada inversamente ao perfil de linfócitos TCD4⁺ CD54⁺ ($p=0,0024$ e $r= - 0,92$; $p=0,0234$ e $r=-0,79$, respectivamente), bem como com células CD4⁺IFN⁺ ($p=0,0086$ e $r=-0,86$) em sangue periférico. Ao avaliarmos a expressão de FOXP3⁺ na população de linfócitos citotóxicos também observamos uma correlação negativa associada a expressão desta metaloproteinase por células tumorais ($p=0,0143$ e $r=-0,87$).

Aos 21 dias, ADAMTS1 expresso em estroma apresentou correlação inversa com células CD4⁺CD54⁺, por outro lado a expressão celular foi correlacionada as células CD8⁺CD54⁺ ($p=0,0112$ e $r=-0,85$). As correlações inversas sugerem que à medida que o tumor cresce ocorre uma maior produção de enzima e maior endereçamento de células do sangue para o sítio tumoral.

Ao analisamos a relação de ADAMTS5 e o infiltrado intratumoral, observamos uma correlação direta com células CD11b⁺ ($p=0,0030$ e $r=0,92$). Aos 28 dias, a expressão da enzima em

estroma apresentou relação com células LT CD4⁺TNF⁺ ($p=0,0492$ e $r=0,77$). Nesse mesmo período, as células T CD8⁺ apresentaram correlação positiva com a expressão da enzima em células tumorais ($p=0,0333$ e $r=0,97$).

Ao avaliarmos a ADAMTS15, não foram observadas correlações com perfil imune nos grupos analisados.

6 DISCUSSÃO

A avaliação do proteoglicano VCAN em modelo murino 4T1 tem sido proposta nointuito de compreender o papel dessa molécula na progressão do câncer de mama. Estudos têm demonstrado que o VCAN desempenha um papel significativo na regulação do microambiente tumoral em 4T1 (FEDERICO et al., 2017). Níveis elevados de VCAN estão associados à invasão tumoral, angiogênese e formação de metástases, o que sugere sua possível contribuição para a agressividade e disseminação do câncer (PAPADAS et al., 2020). Contudo, a participação das enzimas responsáveis pelo remodelamento da MEC ainda é pouco compreendida.

O modelo murino 4T1 é conhecido por ser amplamente utilizado para estudar os estágios da progressão do câncer de mama e sua interação com o sistema imunológico (GUO et al., 2020). Essas células, originalmente derivadas de um tumor mamário espontâneo em uma fêmea da linhagem BALB/c, apresentam características semelhantes aos tumores de mama triplo negativos em humanos sendo relevante para estudar esse subtipo molecular, sabidamente agressivos e resistentes aos tratamentos convencionais existentes (ARROYO-CRESPO et al., 2019). Este modelo murino compartilha inúmeras alterações moleculares com os tumores triplo negativos, incluindo a fraca ou ausência de expressão de receptores de estrógeno, progesterona e HER-2, o que reforça os estudos pré-clínicos com o 4T1 (SCHRORS et al., 2020).

Outra característica importante do modelo 4T1 é o crescimento progressivo do tumor no sítio primário, seguido pela invasão local dos tecidos circundantes e a formação de metástases no pulmão espontâneas a partir da segunda semana, achados confirmados no presente experimento, corroborando com estudos prévios de Dos Reis e colaboradores (2019) e Yang, Zhang e Huang (2013).

A deposição de colágeno no câncer de mama é um fenômeno complexo que está sendo cada vez mais estudado para compreender melhor sua influência no desenvolvimento e progressão do câncer. O colágeno é uma proteína estrutural essencial na matriz extracelular dos tecidos e desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade dos órgãos, na migração celular, na angiogênese e na remodelação do tecido (XU et al., 2019). No contexto do câncer, várias pesquisas têm explorado como as mudanças na composição e organização da matriz extracelular, incluindo a deposição de diferentes tipos de colágeno, podem afetar o comportamento das células

cancerígenas e a resposta do sistema imunológico (ROMER; THORSETH; MADSEN, 2021; FUJISAKI; FUTAKI, 2022).

Inicialmente, observamos uma maior deposição de colágeno tipo III ao compararmos com os dados de colágeno tipo I. Sabe-se que o colágeno tipo III contribui para a elasticidade da MEC e essas mudanças na elasticidade ou rigidez tecidual podem influenciar na capacidade das células tumorais moverem-se e disseminarem-se. Isso pode indicar que, nesse modelo 4T1, a MEC sofre maior deposição de colágeno do tipo III, afetando a comunicação entre as células neoplásicas e seu entorno, além de influenciar na proliferação, invasão e resistência ao tratamento. Esse achado de maior colágeno tipo III contradiz achados anteriores (HSU et al., 2022), onde o colágeno tipo I aparece em maior quantidade em relação ao colágeno tipo III, com predominância de matriz densa e compacta em modelo canino.

Além disso, nesse estudo, ao analisarmos as relações entre tipos de colágeno, VCAN e ADAMTS, vimos que a correlação negativa entre VCAN e colágeno tipo III pode estar associada ao potencial de VCAN em induzir a compactação das fibras. Em câncer de mama em humanos, foi observada uma correlação inversa entre VCAN e colágeno tipo I em áreas *in situ* de carcinomas, diferente dos achados do presente estudo. Em contrapartida, outro estudo com o modelo 4T1 mostrou que o colágeno tipo III foi relacionado a supressão do crescimento do tumor e metástase do câncer de mama (BRISSON, et al., 2015). A correlação positiva com a ADAMTS5 no período de 28 dias, indica a atuação dessa enzima na manutenção dessa matriz frouxa para favorecer a disseminação de nódulos metastáticos tardios e progressão desse carcinoma em camundongos corroborando com estudos prévios (BAY-JENSEN et al., 2016; HSU et al., 2022).

Ademais, ao caracterizarmos a matriz na coloração de Tricromico de Masson (TM) no tumor e no pulmão, os resultados mostraram correlações negativas entre colágeno e VCAN, ADAMTS5 e 15 durante o experimento. Um ambiente rico em colágeno pode dificultar a penetração de células imunológicas no tumor, afetando a eficácia da resposta imune antitumoral. Neste estudo, podemos visualizar que as enzimas e o proteoglicano VCAN não estão relacionadas positivamente com essa deposição de colágeno. Além disso, os colágenos (tipo I e tipo III) estão relacionados de forma favorável à progressão tumoral visto que há um aumento crescente de deposição de colágeno ao longo do experimento, corroborando com os estudos de Song e colaboradores (2021) e Hsu e colaboradores (2022). Na avaliação imuno-histoquímica vimos que o VCAN, VKINA e as ADAMTS1, 5 e 15 foram expressas no estroma tumoral e nas células

tumorais durante a progressão do tumor de câncer de mama. O VCAN teve sua maior expressão no estroma e nas células tumorais no período de 21 e 28 dias, corroborando com os achados prévios em modelo 4T1, câncer de ovário e gastrointestinal (Dos Reis et al., 2019; Voutilainen et al., 2003; Setoguchi et al., 2011). Além da sua forte expressão nas últimas semanas reforça o papel deste proteoglicano na invasão e no desenvolvimento de metástases.

A VKINA apresentou um perfil de expressão um pouco diferente de VCAN, uma vez que teve sua maior expressão no período de 21 dias, a semana em que identificamos as metástases, com um leve declínio no período aos 28 dias. Interessantemente, nas últimas semanas de crescimento tumoral há um predomínio da resposta anti-inflamatória, o que sugere um papel modulador da VKINA favorecendo um microambiente pró-tumoral e metastático (FREY et al., 2013; EBLE, NILAND., 2019). Ademais, VKINA e ADAMTS15 tiveram um comportamento semelhante. A relação de ADAMTS15, matriquina e angiogênese tumoral já foi descrita previamente (BINDER et al., 2017; ASANO et al., 2017). Aparentemente, a proteólise de VCAN é um importante processo para o remodelamento da MEC e organização de novos vasos, criando um cenário facilitador a metástase.

As enzimas ADAMTS1 foram as que apresentaram maior intensidade de marcação tanto nas células neoplásicas como no estroma tumoral do câncer de mama desses camundongos. A forte marcação de ADAMTS1 em mieloma múltiplo foi relatada no estudo de Hope e colaboradores 2016, contrariando achados prévios em câncer de mama e de câncer colorretal em humanos (FILOU, et al 2015) e carcinomas mamários em cadelas (Souza, 2021), onde as marcações eram raras ou ausentes. O modelo 4T1 parece expressar mais esta enzima, mas os motivos para discrepância com outras espécies e modelos de estudo não são esclarecidos.

No modelo 4T1, a resposta inflamatória desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão do tumor, bem como na interação entre o sistema imunológico e as células tumorais. Ao longo dos primeiros dias após a inoculação das células tumorais, as células inflamatórias começam a infiltrar-se no sítio tumoral. Os macrófagos, por exemplo, podem se diferenciar em subtipos pró-inflamatórios (M1) quando secretam o padrão de citocinas como IL-12⁺ e TNF⁺ e estimula linfócitos TH1 ou anti-inflamatórios (M2) quando secretam IL-10⁺ e expressam arginase, dependendo do ambiente tumoral naquele período de progressão (SAQIB et al 2018). Em um estudo realizado por DeNardo et al. (2009), foi investigado a resposta inflamatória no adenocarcinoma em relação à função dos macrófagos. Eles demonstraram que os macrófagos infiltrados no tumor eram

principalmente do tipo M2, que exibem propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Os resultados indicaram que a resposta inflamatória no modelo de câncer é influenciada pela polarização dos macrófagos para o fenótipo M2.

Nota-se uma atuação sinérgica dos dois mecanismos pró- e anti-inflamatórios no desenvolvimento metastático do tumor 4T1, com predomínio do perfil pró-inflamatório até a terceira semana e anti-inflamatório na última semana de crescimento tumoral. Neste contexto, as correlações de VCAN e VKINA com o infiltrado inflamatório revelou que a VKINA se correlacionou com uma resposta anti-inflamatória, uma vez que apresenta correlação positiva com expressão de arginase, IL-10 e redução de IL-12, sugerindo que há um recrutamento de macrófagos M2 para o microambiente tumoral na última semana do experimento. Um estudo de Zong e colaboradores (2021) também relata que no microambiente tumoral mamário secreta sinais e fatores que podem levar à polarização dos macrófagos para o fenótipo M2. Células cancerosas e componentes do estroma tumoral liberam citocinas, como IL-4 e IL-13, que contribuem para a diferenciação dos macrófagos M2. Macrófagos M2 produzem citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que podem suprimir a atividade antitumoral das células imunes efetoras.

Ao analisar o VCAN, observou-se uma resposta inflamatória contrária à matriquina. O perfil de inflamação relacionado com esse componente da matriz extracelular correlacionou-se com linfócitos TCD4⁺ expressando a molécula de adesão L-selectina (CD62L⁺) e de linfócitos Th1 (T CD4 IFN⁺) aos 28 dias, sugerindo uma relação de VCAN com uma resposta adaptativa e pró-inflamatória.

Além disso, a expressão de VCAN e VKINA tanto no estroma e nas células tumorais teve relação com a presença de células mieloides CD11b⁺ no sítio tumoral. A contribuição dessas células está envolvida na ativação da resposta imunológica adaptativa contra as células tumorais 4T1. Um estudo mais recente de Li e colaboradores (2018) observaram que essas células de origem mielóide CD11b capturavam antígenos tumorais e os apresentavam aos linfócitos T, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expansão das células T citotóxicas CD8⁺. Esse cenário tem uma maior compatibilidade com o perfil inflamatório do VCAN devido às relações relatadas anteriormente. Também foram avaliadas as versicanases 1, 5 e 15, enzimas metaloproteinases que desempenham um papel importante em processos biológicos como remodelação da matriz extracelular, angiogênese e regulação da resposta imunológica. O papel da enzima ADAMTS1 foi estudado em vários tipos de câncer. No entanto, existe controvérsia em relação à oncologia

e o papel dessa versicanase, pois ela pode atuar como um supressor ou como facilitador da progressão tumoral, dependendo do contexto celular inserido. O trabalho de Tan, et al., 2019 evidenciou que a ADAMTS1 está fortemente correlacionada com a metástase do câncer de mama. Contudo, no estudo de Noriega-Guerra et al., 2018, essa metaloproteinase pode ter uma atividade supressora no crescimento e progressão de células tumorais, diminuindo a proliferação de células de fibrossarcoma e a velocidade de migração. No estudo realizado por Oller e colaboradores. (2018) investigou-se o papel da ADAMTS5 na resposta inflamatória em camundongos. Os pesquisadores descobriram que a expressão dessa enzima estava associada à regulação de citocinas inflamatórias. A superexpressão de ADAMTS5 no tumor resultou em um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8, pelas células tumorais, evidenciando a ação da ADAMTS5 na promoção da resposta inflamatória. Corroborando com os achados prévios, observamos uma correlação da ADAMTS5 com a molécula pró-inflamatória TNF e linfócitos T CD8⁺ na última semana do experimento. Essa associação sugere que esta metaloproteinase pode promover a produção de moléculas pró-inflamatórias no microambiente.

O trabalho de Vilorio et al. (2009) investigou a associação entre a expressão da ADAMTS15 e o câncer colorretal. Os pesquisadores observaram que a ADAMTS15 estava expressa em níveis mais baixos em tumores de câncer colorretal do que em tecido normal adjacente. A diminuição da expressão da ADAMTS15 estava correlacionada com a invasão tumoral, metástase linfonodal e pior prognóstico, indicando seu possível papel como supressor tumoral nesse contexto. Embora esse estudo não esteja diretamente relacionado ao modelo murino 4T1, eles destacam o potencial da ADAMTS15 em influenciar a progressão tumoral em outros tipos de câncer. Considerando que as ADAMTSs têm papéis semelhantes na remodelação da matriz extracelular e no comportamento tumoral, é possível que a ADAMTS15 também desempenhe um papel na progressão do câncer de mama metastático no modelo murino 4T1, já que observamos uma maior expressão dessa enzima no período em que há o aparecimento de metástases, indicando o papel dessa MMP na progressão do câncer de mama, assim como relatado em outros trabalhos prévios (PORTER et al., 2006).

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados, a crescente expressão de VCAN, VKINA, ADAMTS1, 5 e 15 são evidentes ao longo do crescimento tumoral e progressão dos tumores 4T1, especialmente pelas células tumorais. Concomitantemente, há um aumento favorável dos diferentes tipos de colágeno, indicando uma alta deposição de colágeno no estágio final do câncer de mama o que implica em uma maior dificuldade para as células do sistema imunológico penetrarem na matriz para a destruição desse tumor.

VCAN, ADAMTS 1 e 5 apresentaram maior expressão nas últimas semanas do experimento, com correlação direta ao perfil predominantemente pró-inflamatório. No entanto, VKINA e ADAMTS15 apresentaram maior expressão na terceira semana, quando há o surgimento de metástases nesse modelo. Além da alta expressão de VKINA em 21 dias, este proteólito teve relação com perfil imune predominantemente anti-inflamatório, criando um microambiente favorável a progressão do tumor.

É notório uma atuação sinérgica dos dois mecanismos pró - e anti-inflamatório ao longo do experimento, com predomínio do perfil anti-inflamatório na terceira semana de crescimento tumoral, quando ocorre maior expressão da VKINA e ADAMTS-15, sugerindo uma relação entre degradação da MEC e perfil inflamatório. Contudo, ainda se faz necessário compreender os efeitos destes perfis celulares no remodelamento da matriz extracelular com relação das versicanases e seu proteólito nos diferentes tempos de progressão.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K et al. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. [s.l.]: Elsevier, 2015.
- ABEN-ATHAR, C. Y. U. P. et al. Conhecimento de enfermeiros sobre genética e genômica aplicado ao câncer de mama. **REME-Revista Mineira de Enfermagem**, v. 25, n. 1, 6 set. 2021.
- ALBINI, A.; SPORN, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature Reviews*. **Cancer**, v. 7, n. 2, p. 139–147, fev. 2007.
- ANASTASIADI, Z. et al. Breast cancer in young women: an overview. **Updates in Surgery**, v. 69, n. 3, p. 313–317, set. 2017.
- ARROYO-CRESPO, J. J. et al. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 8, p. 2267–2281, 15 out. 2019.
- ASANO, Keiichi et al. Stromal Versican Regulates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, p.17225, 2017.
- BAGHBAN, R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, p. 59, 7 abr. 2020.
- BAY-JENSEN, A.-C. et al. A novel serological type III collagen a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) degradation marker for assessment of the extracellular matrix remodeling in patients with osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, p. S85–S86, 1 abr. 2016.
- BINDER, Marley J. et al. The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyaluronan proteoglycans and ADAMTS enzymes. **Cancer Letters**, v. 385, p. 55–64, 2017.
- BONNANS, Caroline; CHOU, Jonathan; WERB, Zena. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.
- BRISSON, B. K. et al. Type III collagen directs stromal organization and limits metastasis in a murine model of breast cancer. **The American Journal of Pathology**, v.185, n. 5, p. 1471–1486, maio 2015.
- CANAVESE, G. et al. Expression of proteoglycan versican in in situ breast lesions: relations between stromal changes, histotype, and invasion. **Pathology, Research and Practice**, v. 207, n. 2, p. 97–103, 15 fev. 2011.
- CASSIANO, A. S. **Câncer de mama triplo negativo e sua relação com o sistema imune**. 2022.

CONDE, E. et al. FOXP3 expression diversifies the metabolic capacity and enhances the efficacy of CD8 T cells in adoptive immunotherapy of melanoma. **Molecular Therapy**, v.31, n. 1, p. 48–65, 4 jan. 2023.

COUSSENS, Lisa M.; WERB, Zena. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p.860–867, 2002.

DAMASCENO, K. A. et al. Relationship between the expression of versican and EGFR,HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland. **Histology and Histopathology**, v. 31, n. 6, p. 675–688, jun. 2016.

DENARDO, D. G. et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. **Cancer Cell**, v. 16, n. 2, p.91–102, 4 ago. 2009.

DI GIOACCHINO, M. et al. AllergoOncology: Role of immune cells and immune proteins. **Clinical and Translational Allergy**, v. 12, n. 3, p. e12133, mar. 2022.

DOS REIS, D. C. et al. Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma. **Frontiers inOncology**, v. 9, p. 577, 2019.

EDECHI, Chidalu A. et al. The Prolactin Inducible Protein Modulates Antitumor Immune Responses and Metastasis in a Mouse Model of Triple Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 639859, 2021.

EL HAGE, Faten et al. Immuneresponse and cancer. **Bulletin Du Cancer**, v. 95, n. 1, p. 57–67, 2008.

ELLIOTT, David E.; SIDDIQUE, Sana S.; WEINSTOCK, Joel V. Innate Immunity in Disease. **Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 12, n. 5, p. 749–755, 2014.

FARHOODI, Henry P. et al. Optimization of a syngeneic murine model of bone metastasis. **Journal of Bone Oncology**,v. 23, p. 100298, 2020.

FEDERICO, Lorenzo et al. A murine preclinical syngeneic transplantation model for breast cancer precision medicine. **Science Advances**,v. 3, n. 4, p. e1600957, 2017.

FILOU, S. et al. ADAMTS Expression in Colorectal Cancer. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p.e0121209, 18 mar. 2015.

FREIRE, D. Imunoterapia: a virada do sistema imunológico contra o câncer. **Ciência eCultura**, v. 71, n. 4, p. 13–15, out. 2019.

GERADA, Chelsea; RYAN, Kevin M. Autophagy, the innate immune response and cancer. **Molecular Oncology**, v. 14, n. 9, p. 1913–1929, 2020.

GONG, Yue et al. Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. **Cell Metabolism**, v.33, n. 1, p. 51-64.e9, 2021.

GONZALEZ, H.; HAGERLING, C.; WERB, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. **Genes & Development**, v. 32, n. 19–20, p.1267–1284, 1 out. 2018.

GUO, Jian et al. Mouse 4T1 Breast Cancer Cell– Derived Exosomes Induce Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages via miR-183. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 10, p. 2916–2925, 2020.

HAN, H. S. et al. Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer Journey: Beginning, End, and Everything in Between. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, n. 43, p. e390464, jun. 2023.

HARAGUCHI, N. et al. High expression of ADAMTS5 is a potent marker for lymphatic invasion and lymph node metastasis in colorectal cancer. **Molecular and Clinical Oncology** 6, 130–134, 2017.

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 2019.

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

HOWARD, B. A.; LU, P. Stromal regulation of embryonic and postnatal mammary epithelial development and differentiation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.25–26, p. 43–51, 2014.

HUBALEK, Michael; CZECH, Theresa; MÜLLER, Hannes. Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. **Breast Care (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 1, p. 8–14, 2017.

HUMPHREY, Jay D.; DUFRESNE, Eric R.; SCHWARTZ, Martin A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 802–812, 2014.

HSU, K.-S. et al. Cancer cell survival depends on collagen uptake into tumor-associated stroma. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 7078, 18 nov. 2022.

INSUA-RODRÍGUEZ, Jacob; OSKARSSON, Thordur. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016.

JHAN, J.-R.; ANDRECHEK, E. R. Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. **Pharmacogenomics**, v. 18, n. 17, p. 1595–1609, nov. 2017.

JIMENEZ, S. Resposta imunológica do câncer de mama, **Anais 20º Seminários de Iniciação Científica da Uniandrade-2022/2023**, v. 20, n. 20, 25, 2023.

- KASIKARA, Canan et al. Pan-TAM Tyrosine Kinase Inhibitor BMS-777607 Enhances Anti-PD-1 mAb Efficacy in a Murine Model of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 10, p. 2669–2683, 2019.
- KELWICK, Richard et al. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 113, 2015.
- KISCHEL, P. et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 640–650, 1 fev. 2010.
- KUWABARA, Hiroko; YONEDA, Masahiko; ISOGAI, Zenzo. Expressional Alterations of Versican, Hyaluronan and Microfibril Associated Proteins in the Cancer Microenvironment. [s.l.]: IntechOpen, 2013.
- LA CAVA, Francesca et al. An ultrasound-guided injection method for a syngeneic orthotopic murine model of breast cancer. **Laboratory Animals**, v. 55, n. 5, p. 472–477, 2021.
- LAMBERT, J. et al. ADAMTS-1 and syndecan-4 intersect in the regulation of cell migration and angiogenesis. *Journal of Cell Science*, v. 133, n. 7, 8 abr. 2020.
- LEBERT, J. M. et al. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. **Current Oncology (Toronto, Ont.)**, v. 25, n. Suppl 1, p. S142–S150, 2018.
- LEHMANN, Brian D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 2011.
- LI, C. et al. ADAMTS12 acts as a cancer promoter in colorectal cancer via activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway in vitro. **Annals of Translational Medicine** 8, 301–301, 2020.
- LI, X. et al. Pro-tumoral immune cell alterations in wild type and Shb-deficient mice in response to 4T1 breast carcinomas. **Oncotarget**, v. 9, n. 27, p. 18720–18733, 10 abr. 2018.
- LI, Y. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, p. 121, 29 ago. 2022.
- LIEW, Pei Xiong; KUBES, Paul. The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223–1248, 2019.
- MAIA, L. P. Caracterização molecular e imunológica da via dos esfingolipídios em tecido tumoral e em células do sistema imune no câncer de mama. 30 jul. 2015.
- MERINO BONILLA, J. A.; TORRES TABANERA, M.; ROS MENDOZA, L. H. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. **Radiologia**, v. 59, n. 5, p. 368–379, 2017.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p.552–580, out. 2010.

MCKELVEY, Kelly J. et al. Radiation, inflammation and the immune response in cancer. **Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 29, n. 11–12, p. 843–865, 2018.

MULDER, Willem J. M. et al. Therapeutic targeting of trained immunity. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 18, n. 7, p. 553–566, 2019.

MURALIDHARAN, Sujatha; MANDREKAR, Pranoti. Cellular stress response and innate immune signaling integrating pathways in host defense and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 6, p. 1167–1184, 2013.

NAJAFI, Masoud; FARHOOD, Bagher; MORTEZAEE, Keywan. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.120, n. 3, p. 2782–2790, 2019.

NANDADASA, Sumeda; FOULCER, Simon; APTE, Suneel S. the multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 35, p. 34–41, 2014.

NORIEGA-GUERRA, H. et al. ADAMTS-1 disrupts HGF/c-MET signaling and HGF- stimulated cellular processes in fibrosarcoma. **Experimental Cell Research**, v. 363, n. 2, p.271–282, 15 fev. 2018.

OLGUÍN, J. E. et al. Early and partial reduction in cd4+foxp3+ regulatory t cells during colitis-associated colon cancer induces cd4+ and cd8+ t cell activation inhibiting tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 2, p. 239–249, 2018.

OZGA, Aleksandra J.; CHOW, Melvyn T.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and the immune response to cancer. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 859–874, 2021.

PAPADAS, Athanasios et al. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v.68, n. 12, p. 871–885, 2020.

PAPADAS, Athanasios; ASIMAKOPOULOS, Fotis. Versican in the Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1272, p. 55–72, 2020.

PAPADAS, A. et al. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 68, n. 12, p. 871–885, dez. 2020.

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

- PORTER, S. et al. ADAMTS8 and ADAMTS15 expression predicts survival in human breast carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1241–1247, 1 mar.2006.
- PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current Protocols in Immunology**, v. Chapter 20, p. Unit 20.2, maio 2001.
- RASHID, Omar M. et al. An improved syngeneic orthotopic murine model of human breast cancer progression. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 147, n. 3, p. 501–512, 2014.
- REDONDO-GARCÍA, S. et al. ADAMTS proteases and the tumor immune microenvironment: Lessons from substrates and pathologies. **Matrix Biology Plus**, 2021.
- REICHE, Edna Maria Vissoci; NUNES, Sandra Odebrecht Vargas; MORIMOTO, Helena Kaminami. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet. Oncology**, v.5, n. 10, p. 617–625, 2004.
- RODRIGUEZ-BAENA, F. J. et al. ADAMTS1 protease is required for a balanced immune cell repertoire and tumour inflammatory response. **Scientific Reports**, 2018.
- ROMER, A. M. A.; THORSETH, M.-L.; MADSEN, D. H. Immune Modulatory Properties of Collagen in Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 791453, 2021.
- SCHMITT, Michael. Versican vs versikine: tolerance vs attack. **Blood**, v. 128, n. 5, p. 612–613, 2016.
- SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937–17950, 3 abr. 2018.
- SCHRÖRS, Barbara et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1195, 2020.
- SINGH, Nitin et al. Inflammation and Cancer. **Annals of African Medicine**, v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.
- SHAMSI, Mahdiyeh; PIRAYESH ISLAMIAN, Jalil. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. **Nuclear Medicine Review. Central & Eastern Europe**, v. 20, n. 1, p. 45–48, 2017.
- SHANG, X. Q. et al. ADAMTS4 is upregulated in colorectal cancer and could be a useful prognostic indicator of colorectal cancer. **Revista da Associação Médica Brasileira** 66, 42–47, 2020.
- SPORIKOVA, Zuzana et al. Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 18, n. 5, p. e841–e850, 2018.

STEENBRUGGE, J. et al. Comparative Profiling of Metastatic 4T1- vs. Non-metastatic Py230-Based Mammary Tumors in an Intraductal Model for Triple-Negative Breast Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 17 dez. 2019.

SONG, K. et al. Collagen Remodeling along Cancer Progression Providing a Novel Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10509, 10 set. 2022.

SUND, M.; KALLURI, R. Tumor stroma derived biomarkers in cancer. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 177–183, jun. 2009.

TAN, I. A. et al. ADAMTS1 promotes adhesion to extracellular matrix proteins and predicts prognosis in early-stage breast cancer patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2019.

VAZ, Adelaide José et al. **Imunoensaaios: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Acesso em: 15 ago. 2023., 2018

VESELY, Matthew D. et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 235–271, 2011.

VILORIA, C. G. et al. Genetic inactivation of ADAMTS15 metalloprotease in human colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 11, p. 4926–4934, 1 jun. 2009.

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. E3028, 2018.

WANG, Q. et al. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 10, p. 11149–11165, 2023.

WON, Kwang-Ai; SPRUCK, Charles. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 6, p. 1245–1261, 2020.

XIA, Longzheng et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, p. 28, 2021.

XU, S. et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, p. 309, 14 set. 2019.

YANG, Shengyu; ZHANG, J. Jillian; HUANG, Xin-Yun. Mouse models for tumor metastasis. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 928, p. 221–228, 2012.

YIN, Li et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research: BCR**, v. 22, p. 61, 2020.

ZANETTI, G. E. **Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes jovens com câncer de mama**. [s.l.]: Universidade de São Paulo, 2015.

ZHAI, L. et al. Overexpressed versican promoted cell multiplication, migration and invasion in gastric cancer. **Tissue & Cell**, v. 73, p. 101611, dez. 2021.

ZHANG, Y. et al. Enhanced PAPSS2/VCAN sulfation axis is essential for Snail-mediated breast cancer cell migration and metastasis. **Cell Death and Differentiation**, v. 26, n. 3, p. 565–579, mar. 2019.

ZHANG, Y. et al. Inactivation of ADAMTS18 by aberrant promoter hypermethylation contribute to lung cancer progression. **Journal of Cellular Physiology** 234, 6965–6975 2019.

ZHANG, Q. et al. Upregulation of versican associated with tumor progression, metastasis, and poor prognosis in bladder carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 6949864, 2021.

ZHENG, Z. et al. Lung mesenchymal stromal cells influenced by Th2 cytokines mobilize neutrophils and facilitate metastasis by producing complement C3. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6202, 27 out. 2021.

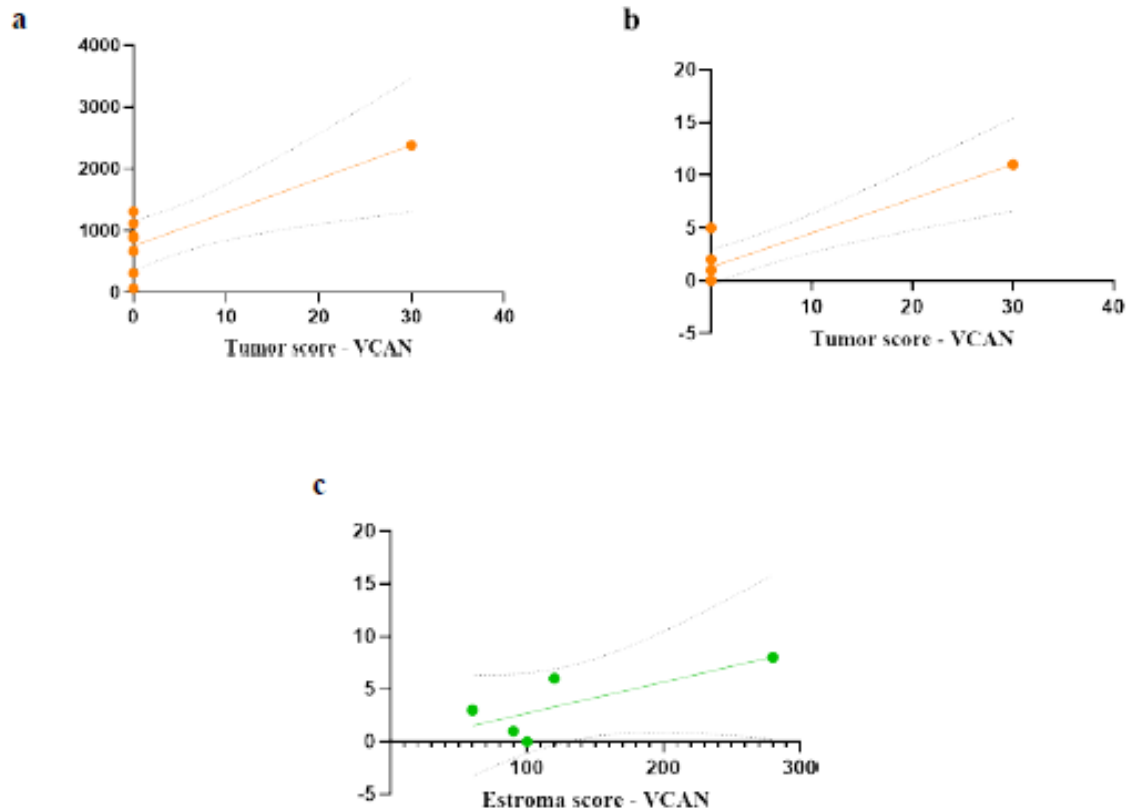
ZONG, S. et al. LncRNA-SNHG1 promotes macrophage M2-like polarization and contributes to breast cancer growth and metastasis. **Aging**, v. 13, n. 19, p. 23169–23181, 7 out. 2021.

Anexo A

7 DIAS	CD4	CD8	CD4/CAM	CD8/CAM	CD4/CD2	CD8/CD2	CD11b/CAM	CD4/PERF	CD8/PERF	CD4/FOXp3	CD8/FOXp3
MÉDIA	9,357	19,96	46,86	25,57	228,10	285,40	23,57	0,5714	8,714	3,429	14,57
DESVIO PADRÃO	9,788	12,37	51,04	37,86	88,80	144,00	12,19	1,512	16,30	8,203	25,31
14 DIAS											
MÉDIA	35,23	20,00	324,0	403,0	522,9	484,4	47,50	0,000	3,500	0,000	1,125
DESVIO PADRÃO	7,075	4,637	165,9	158,5	230,3	342,2	47,29	0,000	2,619	0,000	1,356
21 DIAS											
MÉDIA	24,50	13,35	19,37	106,9	88,75	93,88	334,8	0,000	69,83	50,83	496,0
DESVIO PADRÃO	8,323	9,844	11,45	95,25	73,48	72,14	344,6	0,000	71,16	53,41	315,0
28 DIAS											
MÉDIA	22,88	57,60	63,40	20,60	3,600	169,0	255,0	0,000	8,857	15,14	373,4
DESVIO PADRÃO	3,114	26,16	18,76	10,21	3,362	116,5	79,58	0,000	12,65	9,616	422,5

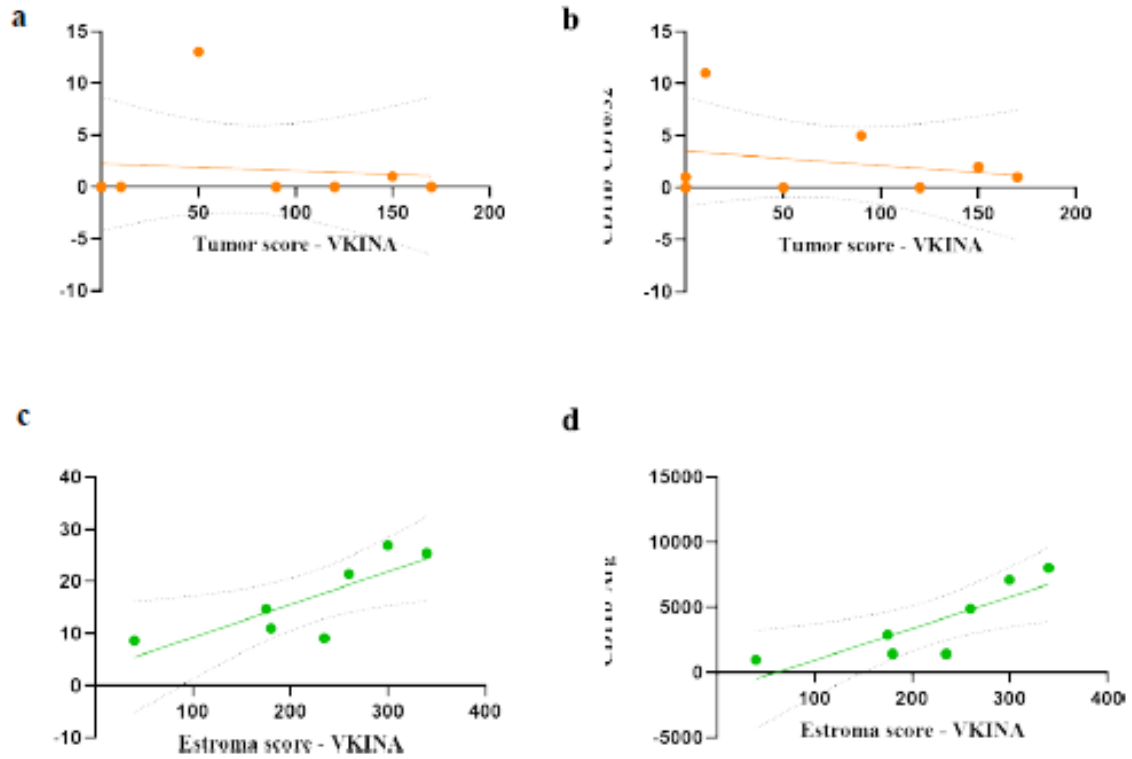
CDQEN	CD8EN	CD4IL10	CD8IL10	CD4TNE	CD8TNE	CD16	CD11bARG	CD11bIL12	CD11bIL2	CD11bCD1632	CD11bMHCII	CD11b
52,00	108,4	3,429	0,000	40,86	12,71	1637	2553	693,3	1,714	49,43	326,3	67,81
67,80	125,0	4,894	0,000	82,43	18,41	2039	2101	839,1	2,928	36,65	327,4	32,48
584,1	110,9	3,125	4,250	9,000	2,750	3601	3224	954,9	1,750	2,500	53,88	347,9
209,8	296,3	2,748	4,892	6,782	4,062	818,4	614	706,4	4,559	3,817	55,82	162,8
24,63	25,38	67,83	17,83	31,67	71,00	6824	966,1	4600	36,88	158,9	192,4	823,9
15,58	45,44	86,37	9,326	32,10	29,74	1964	1199	1462	19,07	76,47	125,5	628,3
53,00	4,600	190,4	82,86	21,43	19,43	45,16	3828	887,9	56,63	278,4	606,0	2655
42,93	2,702	121,6	136,4	27,80	13,23	20,38	2888	931,8	65,88	353,3	277,8	1356

Anexo B - Gráficos de correlação do VCAN, VKINA e ADAMTS com o sistema imunológico VERSICAN



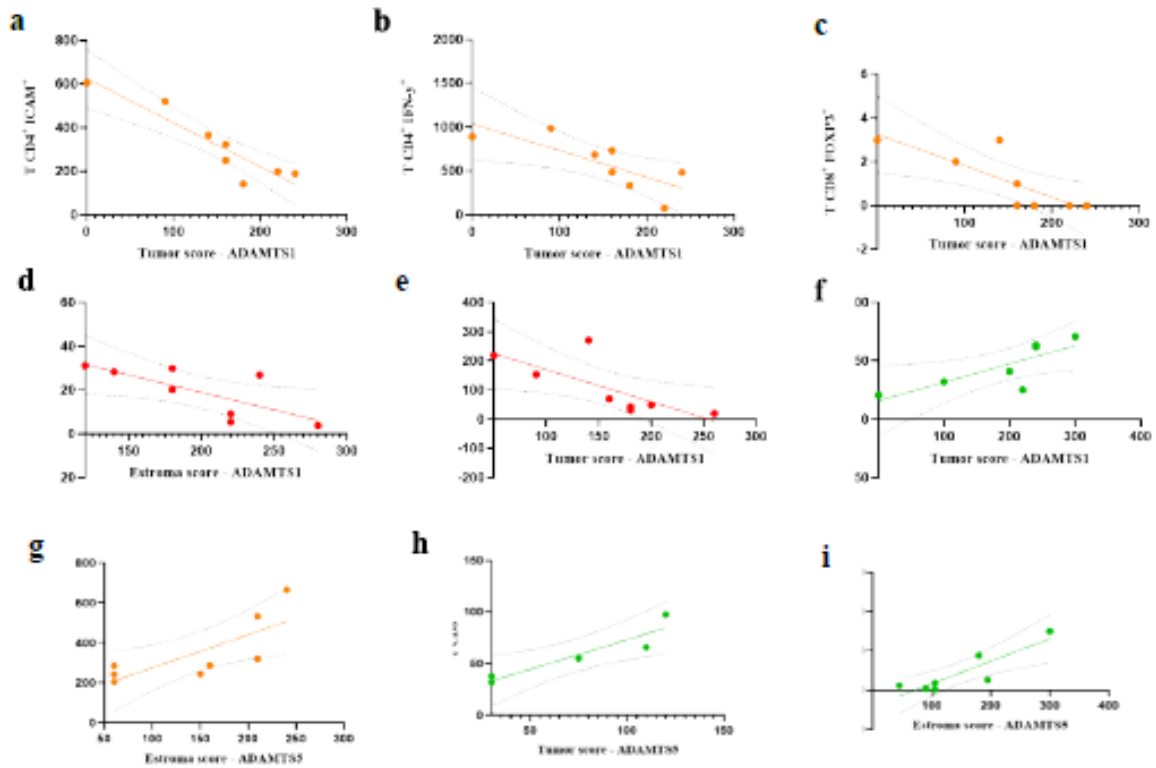
Correlação da expressão VCAN no estroma e nas células tumorais com as células imunes no grupo de 14 dias ($p=0.0134$ e $r=0,67$) com CD11b+IL-12+ (a), no grupo de 28 dias ($p=0,0377$ e $r=0,75$) com CD11b+CD16/32+ (b) e no grupo de 28 dias (c) com T CD4+ CD62L+ ($p=0,0333$ e $r=0,97$). Curva de regressão linear simples.

Anexo C – Versikina



Correlação da expressão VKINA no estroma e nas células tumorais com as células imunes no grupo de 14 dias ($p=0,0325$ e $r=0,77$) com CD11b+IL-2+ (a), no grupo de 14 dias ($p=0,0127$ e $r=0,84$) com CD11b+CD16/32+ (b), no grupo de 28 dias (c) com CD11b+ ($p=0,0341$ e $r=0,82$) e no grupo de 28 dias (d) com CD11b+Arg+ ($p=0,0238$ e $r=0,86$). Curva de regressão linear simples.

Anexo D - ADAMTS1, 5



Correlação da expressão das ADAMTS1 e 5 no estroma e nas células tumorais com as células imunes no grupo de 14 dias ($p=0,0024$ e $r=-0,92$) com T CD4⁺ICAM⁺ (a), no grupo de 14 dias ($p=0,0086$ e $r=-0,86$) com T CD4⁺ IFN⁺ (b), no grupo de 14 dias (c) com T CD8⁺ FOXP3⁺ ($p=0,0143$ e $r=-0,87$), no grupo de 14 dias (g) com CD11b⁺ ($p=0,0030$ e $r=0,92$), no grupo de 21 dias (d) com T CD4⁺ICAM⁺ ($p=0,0234$ e $r=-0,79$), no grupo de 21 dias (e) com T CD8⁺ICAM⁺ ($p=0,0112$ e $r=-0,85$), no grupo de 28 dias (f) com CD16⁺ ($p=0,0151$ e $r=0,88$), no grupo de 28 dias (h) com T CD8⁺