

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR E
SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO E/OU DEGRADAÇÃO DE VERSICAN NOS
CARCINOMAS MAMÁRIOS**

SAMANTHA HELLEN SANTOS FIGUERÊDO

Salvador – Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR E
SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO E/OU DEGRADAÇÃO DE VERSICAN NOS
CARCINOMAS MAMÁRIOS**

SAMANTHA HELLEN SANTOS FIGUERÊDO

Orientador: Dra. Karine Araújo Damasceno

Coorientadora: Dra. Maria Lourdes Farre Vallve

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

Salvador – Bahia

2020

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

Figueirêdo, Samantha Hellen Santos.
F475c Caracterização morfológica da matriz extracelular e sua relação com expressão
e/ou degradação de versican nos carcinomas mamários. / Samantha Hellen Santos
Figueirêdo. - 2020.
94 f. : il. ; 30 cm.

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

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

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

CDU 618.19-006

“CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO E/OU DEGRADAÇÃO DE VERSICAN NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS”.

SAMANTHA HELLEN SANTOS FIGUEREDO

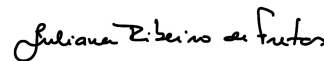
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de dezembro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Juliana Ribeiro de Freitas
Professora Assistente
UFBA



Dr. Sergio Marcos Arruda
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES–

Código de financiamento 001

Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada seria possível. Gratidão por tudo.

Aos meus pais, Cândido e Sivalda (*in memoriam*), por sempre apoiarem e financiarem meus sonhos.

Aos meus amigos, amor e colegas, pelo estímulo e por sempre acreditarem no meu potencial.

A orientação de Dra. Karine Araújo Damasceno e Dra. Maria Lourdes Farre Vallve, muito obrigada pela oportunidade e conhecimentos compartilhados durante todo esse período de trabalho.

Ao Dr. Carlos Alberto, médico patologista no Laboratório de Anatomia Patológica do HUPES, pela coleta e análise dos casos para a realização deste trabalho.

À Dra. Helenice Gobbi pela análise dos casos.

Aos meus colegas e amigos que estão ou passaram pelo grupo GOC (Grupo de Oncologia Comparada): Rafael que me acompanhou durante a iniciação científica, Maria do Punk, Isac, Simone e Bruno que ajudaram bastante e especialmente Maria Carolina que foi uma super parceira desde a seleção de mestrado até nos conselhos de vida durante os períodos difíceis. Todos do grupo foram essenciais para que tudo isso fosse possível.

Ao LAPEX (Laboratório de Patologia Experimental) por toda estrutura e colegas que indiretamente ajudaram a construir este trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

À CAPES pela disponibilização da bolsa de estudo e continuidade do apoio durante a pandemia.

Ao Instituto Gonçalo Moniz, pela estrutura, suporte necessário e conhecimento disponibilizado.

A todos os técnicos das plataformas, especialmente de histotecnologia e microscopia, e aos colaboradores da biblioteca, limpeza, segurança e manutenção do IGM pelo carinho e excelente serviço prestado à instituição e aos estudantes.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

FIGUEREDO, Samantha Hellen Santos. Caracterização morfológica da matriz extracelular e sua relação com expressão e/ou degradação de versican nos carcinomas mamários. 2020. 94 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A expressão do proteoglicano versican tem se destacado no microambiente tumoral devido a sua relação com perda de adesão e invasividade celular, desenvolvimento de metástases, bem como a inflamação no contexto do câncer de mama. Versican pode sofrer degradação pela ação de enzimas proteolíticas, dando origem a versikina que, de acordo com estudos recentes, possui papel imunomodulatório no câncer. Contudo, pouco é sabido sobre o seu papel nos diferentes estágios da progressão, grupos histológicos e moleculares dos carcinomas mamários. **OBJETIVO:** Avaliar as modificações na matriz extracelular dos tipos histológicos e moléculas e sua relação com versican e versikina nos carcinomas mamários. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi realizada uma análise retrospectiva de casos de mulheres diagnosticadas no período de 2001 a 2017 com carcinoma invasivo sem outra especificação (CI-SOE) ou carcinoma ductal *in situ* (CDIS) no Hospital das Clínicas (HUPES/UFBA). Trinta e sete casos foram elegíveis ao estudo, sendo 32 casos invasores e 5 CDIS. Os tumores foram reclassificados seguindo classificação de tumores de mama da Organização Mundial da Saúde (2019) e foram definidos 4 grupos: G1- CDIS; G2- carcinomas invasores sem tipo especial (CI-SOE); G3- CI-SOE com áreas *in situ*; G4- outros carcinomas invasores. Também foram selecionados 5 fragmentos de mama normal para caracterização das colorações e marcadores imuno-histoquímicos. Foram analisados dados clínico-patológicos e imuno-histoquímica para a determinação dos subtipos moleculares, presença de versican e versikina, bem como de P63 para confirmação das áreas carcinomatosas *in situ*. Colorações Picrosirius Red e Tricrômico de Masson foram realizadas para a avaliação morfológica da MEC. **RESULTADOS:** Na análise geral dos casos, versican e versikina foram mais frequentes no estroma adjacente as áreas de invasão celular no tumor em relação ao estroma da mama normal. Nos grupos, houve maior intensidade de versican e versikina no estroma tumoral em relação a mama normal e maior intensidade no G1 em relação às áreas *in situ* do G3. Um extenso infiltrado inflamatório nessas áreas dos CDIS que continham maior presença de versikina foi observado. Além disso, a presença de versican e versikina foi maior no estroma das áreas de invasão do G3 em relação ao G2. Ademais, a intensidade de colágeno tipo I foi discretamente maior nas áreas de invasão, enquanto o colágeno tipo III foi maior nas áreas *in situ*. Correlação negativa forte foi observada entre a presença de colágeno tipo I e versican nas áreas *in situ* e entre colágeno tipo I e versikina nas áreas *in situ* e nas áreas invasoras. Nos grupos histológicos, foi observada maior intensidade de colágeno tipo I e tipo III no grupo G3. Não foram observadas diferenças significativas entre os subtipos moleculares e versican e versikina. **CONCLUSÃO:** A maior expressão de versican nas áreas de invasão reforça o seu papel na invasão celular. A presença de versican e versikina nos CDIS sugerem que eles podem estar relacionados a processos iniciais de progressão dos tumores. Além disso, os dados de correlação negativa entre versican e versikina com colágeno tipo I sugerem processo de proteólise e remodelamento da MEC em estroma peritumoral.

Palavras chave: Câncer de mama; matriz extracelular; degradação; versican.

FIGUERÊDO, Samantha Hellen Santos. Morphological characterization of the extracellular matrix and relationship with the expression and / or degradation of versican in breast carcinomas. 2020. 94 f. il. Dissertation (Master in Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Overexpression of proteoglycan versican has been associated with loss of adhesion, invasiveness, development of metastases and inflammation in breast cancer. Versican can be degraded by the action of proteolytic enzymes, giving rise to versikine that has an immunomodulatory role in cancer according to recent studies. However, it is necessary to know the role in the different stages of progression, histological and molecular subtypes of breast carcinomas. **AIM:** Evaluate the changes in the extracellular matrix of histological types and molecules and their relationship with versican and versikine in breast carcinomas. **MATERIALS AND METHODS:** A retrospective analysis of cases of women diagnosed between 2001 and 2017 with invasive breast carcinoma without special type (IBC-NST) or ductal carcinoma in situ (DCIS) available at Hospital das Clínicas (HUPES / UFBA) was carried out. Thirty-seven were eligible for the study, with 32 invasive cases and 5 DCIS. The tumors were reclassified following the World Health Organization (2019) classification of breast tumors and 4 groups were defined: G1- DCIS; G2- invasive carcinomas without special type (CI-SOE); G3- CI-SOE with *in situ* areas; G4- other invasive carcinomas. Clinical and pathological data were also analyzed and immunohistochemistry analysis was performed to determine the molecular subtypes, presence of versican and versikine, and P63 to confirm the *in situ* carcinomatous areas. Picrosirius Red and Masson's Trichrome stains were performed for the morphological evaluation of MEC. **RESULTS:** Versican and versikine were more present in stroma adjacent to cell invasion in relation to normal breast. There was a greater intensity of versican and versikine in the tumor stroma compared to the normal breast and higher presence of intensity in G1 in than to the *in situ* areas of G3. Interestingly, an extensive inflammatory infiltrate in those areas of the DCIS that contained the greatest presence of versikine was observed. In addition, the presence of versican and versikine was greater in the stroma of the G3 invasion areas compared to the G2. In addition, type I collagen intensity was slightly higher in invasion areas, while type III collagen was higher in *in situ* areas. A strong negative correlation was observed between the presence of type I and versican collagen in *in situ* areas and between type I collagen and versikine in *in situ* areas and in the invasive areas. Higher intensity of type I and type III collagen was observed in the G3 group. No significant differences were observed between the molecular and versican and versikine subtypes. **CONCLUSION:** The higher expression of versican in invasive areas reinforces its role in cell invasion. In addition, the analysis of versican and its proteolyte in histological groups suggests that they may be related to early processes of tumor progression. In addition, the negative correlation data between versican and versikine and type I collagen suggest a process of proteolysis and remodeling of the ECM.

Key-words: Breast cancer; Extracellular matrix; Versican proteolysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de novos casos de câncer para 2018 no mundo para ambos os sexos independentemente da idade. Fonte: adaptado de GLOBOCAN (WHO, 2018).....21
- Figura 2.** Isoformas de Versican. Fonte: adaptado de BINDER et al., 2017.....30
- Figura 3.** Clivagem da isoforma V1 de versican dando origem a versikina.....34
- Figura 4.** Seleção dos casos e espécimes mamários.....38
- Figura 5.** Seleção de área de colágeno tipo I. Coloração Picrosirius Red em luz polarizada.....45
- Figura 6.** Diferenças na imunomarcção de versican (VCAN) e versikina (VKIN) no estroma das áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) dos carcinomas mamários.....52
- Figura 7.** Imunomarcção de versican e versikina nas áreas *in situ* e invasoras dos carcinomas mamários e mama normal53
- Figura 8.** Versican e versikina apresentaram forte correlação positiva no estroma adjacente as proliferações carcinomatosas *in situ*.....54
- Figura 9.** Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) no estroma da mama normal (N) e das áreas *in situ* (IS) dos grupos histológicos....56
- Figura 10.** Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) no estroma da mama normal (N) e das áreas invasoras (IS) dos grupos histológicos.....57

Figura 11. Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) no estroma adjacente às áreas <i>in situ</i> (IS) invasoras (IN) dos carcinomas invasivos sem outra especificação com áreas <i>in situ</i> associadas (grupo G3).....	58
Figura 12. Colágeno total evidenciado pela coloração especial Tricrômico de Masson no estroma da mama normal (N), adjacente às áreas contendo células invasoras (IN) e <i>in situ</i> (IS) dos carcinomas mamários.....	59
Figura 13. Colágeno total em azul evidenciado pela coloração Tricrômico de Masson.....	60
Figura 14. Colágeno tipo I e III evidenciados pela coloração Picrosirius Red (PR) no estroma da mama normal e adjacente às áreas <i>in situ</i> e que continham células invasoras dos carcinomas mamários.....	61
Figura 15. Colágeno tipo I e III evidenciados pela coloração Picrosirius Red em luz polarizada.....	62
Figura 16. Colágeno total evidenciado pela coloração Tricrômico de Masson e colágeno tipo I e III por Picrosirius Red em estroma da mama normal e adjacente às áreas <i>in situ</i> e invasoras dos grupos histológicos.....	65
Figura 17. Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) nos subtipos moleculares de carcinomas mamários.....	67
Figura 18. Painel de imunomarcacão para classificacão dos subtipos moleculares do cãncer de mama.....	69
Figura 19. Graus de intensidade utilizados na análise imuno-histoquímica de versican.....	90
Figura 20. Graus de intensidade utilizados na análise imuno-histoquímica de versican.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Grau histológico de Nottingham.....	40
Tabela 2.	Valores de IPN e prognóstico correspondente.....	41
Tabela 3.	Lista de anticorpos com suas respectivas marcas e diluição adotada.....	41
Tabela 4.	Classificação dos subtipos moleculares de acordo com o padrão de marcação imuno-histoquímico.....	44
Tabela 5.	Características da população de estudo.....	47
Tabela 6.	Características patológicas dos casos analisados.....	49
Tabela 7.	Expressão de versican (VCAN) e versikina (VKIN) no estroma e citoplasma da mama normal (N) nas áreas <i>in situ</i> (IS) e áreas invasoras (IN) dos carcinomas.....	52
Tabela 8.	Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) estroma e citoplasma das áreas <i>in situ</i> (IS) e invasoras (IN) dos grupos histológicos.....	55
Tabela 9.	Correlações entre versican (VCAN) no estroma adjacente às áreas <i>in situ</i> (IS) e invasoras (IN) e versikina (VKIN), deposição de colágeno e invasão vascular.....	64
Tabela 10.	Correlações entre versican (VCAN) no estroma e citoplasma de células das áreas <i>in situ</i> (IS) e invasoras (IN) e versikina (VKIN), colágeno, EGFR, mitose e necrose.....	64
Tabela 11.	Expressão de versican (VCAN) e versikina (VKIN) em relação aos diferentes marcadores preditivos e subtipos moleculares do câncer de mama.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAMTS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i> ; desintegrinas e metaloproteinases com domínios trombospondinas
AH	Ácido hialurônico
CAFs	<i>Cancer-associated fibroblast</i> ; Fibroblastos associados ao câncer
CD14	<i>Cluster of Differentiation 44</i> ; Grupamento de diferenciação 44
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i> ; Grupamento de diferenciação 44
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CI-SOE	Carcinoma invasivo sem outra especificação
CK 5/6	<i>Cytokeratin 5/6</i> ; Citoqueratina 5/6
DDR2	<i>Discoidin domain-containing receptor 2</i> ; Receptor contendo domínio de discoidina 2
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> ; Fator de crescimento epidermal
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> ; Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK2	Extracellular signal-regulated kinases 2; Quinases reguladas por sinal extracelulares 2
GAG	Glicosaminoglicano
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i> ; Receptor do fator de crescimento epidermal-tipo 2
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgar Santos
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IARC	<i>Agency for Research on Cancer</i>
LOX	Lisil oxidase
MEC	Matriz extra celular
METABRIC	<i>Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium</i>
MMP	Metaloproteinases de matriz

OMS	Organização mundial de saúde
RE	Receptor de progesterona
RP	Receptor de estrógeno
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> ; Fator de transformação do crescimento beta
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> ; Inibidores teciduais de metaloproteinases
TNM	<i>Tumor size-lymph nodes-metastasis</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VCAN	Versican
VKIN	Versikina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CÂNCER DE MAMA	20
2.1.1	Epidemiologia do câncer de mama	20
2.1.2	Carcinomas ductais <i>in situ</i> e carcinomas invasivos	21
2.2	SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA	23
2.3	MATRIZ EXTRACELULAR	27
2.3.1	Matriz extracelular no câncer de mama	27
2.3.1.1	<i>Proteoglicano versican</i>	29
2.3.2	<i>Degradação da matriz extracelular no câncer de mama</i>	32
2.3.2.1	<i>Proteólise do proteoglicano versican</i>	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ESPÉCIMES MAMÁRIOS	37
4.2	CLASSIFICAÇÃO TNM PARA TUMORES MALIGNOS	38
4.3	HISTOPATOLOGIA	39
4.4	GRAU HISTOLÓGICO	39
4.5	ÍNDICE PROGNÓSTICO DE NOTTINGHAM	40
4.6	IMUNO-HISTOQUÍMICA	41
4.6.1	Avaliação imuno-histoquímica	42
4.7	AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	43
4.8	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR	44
4.9	ASPECTOS ÉTICOS	45
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
5	RESULTADOS	47
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	47
5.2	CARACTERÍSTICAS DA PATOLÓGICAS	47
5.3	AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE DE VCAN EM ESTROMA DA MAMA	

	NORMAL E ADJASCENTE ÁREAS CARCINOMATOSAS <i>IN SITU</i> E INVASORAS DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS.....	51
5.4	RELAÇÃO ENTRE OS GRUPOS HISTOLÓGICOS E A EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA.....	54
5.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA EM ESTROMA E GRUPOS HISTOLÓGICOS.....	59
5.6	SUBTIPOS MOLECULARES DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA.....	66
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÕES	76
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE A	89
	APÊNDICE B	91
	APÊNDICE C	92
	APÊNDICE D	93

1. INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são as neoplasias mais incidentes entre as mulheres no mundo. É uma doença heterogênea e complexa que se apresenta com diferentes padrões morfológicos e expressão gênica que influenciam no prognóstico e terapêutica (RAKHA et al., 2008; BRAY et al., 2018). Esses tumores são na maioria carcinomas invasores e se originam de lesões precursoras, chamadas de carcinomas ductais *in situ* (CDIS), nos quais muitas alterações moleculares e características de malignidade já estão presentes. Contudo, esse modelo de progressão não é obrigatório (BUERGER et al., 1999; ALLRED, 2010).

Anteriormente, a definição do prognóstico das pacientes com neoplasias mamárias era estabelecida por meio apenas dos tipos histológicos e dos fatores como grau histológico e estadiamento, critérios que isoladamente apresentam limitada capacidade preditiva (WEIGEL; DOWSETT, 2010). Com a determinação dos perfis moleculares, é possível fornecendo mais informações para a tomada de decisão no manejo clínico devido ao valor prognóstico e terapêutico (REIS-FILHO; LAKHANI, 2006; DAI, 2015).

Os subtipos moleculares foram definidos quanto a variação nos padrões de expressão gênica dos tumores por Perou e colaboradores (2000). Mais recentemente foi acrescido do marcador de proliferação celular (Ki-67) e de marcadores de células basais, CK 5/6 (Citoqueratina 5/6) e EGFR (*Epidermal Growth factor receptor*) (NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008; WEIGEL; DOWSETT, 2010). Os subtipos moleculares dos carcinomas mamários são luminal A, luminal B, superexpressão de HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) e triplo-negativos. Essa classificação utilizada na rotina oncológica identifica, por imunohistoquímica, os marcadores específicos no material histopatológico. Esses marcadores conferem diferentes terapias de acordo com a expressão dos marcadores definidos para cada subtipo (SØRLIE et al., 2003; NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008; PRAT et al., 2015). Os triplo-negativos e HER-2 indicam um pior prognóstico. Por outro lado, os subtipos luminal A e luminal B revelam prognósticos bom e intermediário, respectivamente (SØRLIE et al., 2001, 2003).

Entretanto, não somente as características genéticas e epigenéticas explicam a heterogeneidade dos tumores. O microambiente contribui ativamente, induzindo alterações celulares em resposta aos estímulos enviados pelas células tumorais

(LIOTTA; STEEG; STETLER-STEVENSON, 1991). Neste contexto, a matriz extracelular (MEC) desempenha importante papel na progressão tumoral. Entre os componentes da MEC, existem evidências de que o proteoglicano hialectano versican (VCAN) contribui para o processo de malignização e migração das células neoplásicas (YEE et al., 2007).

A deposição de VCAN nas áreas adjacentes as células neoplásicas tem sido associada ao alto grau histológico e pode ser um importante fator preditivo de recidiva em mulheres com carcinomas mamários sem metástase para linfonodo (SUWIWAT et al., 2004). Além disso, sua maior expressão também tem sido frequentemente associada à invasão local e angiogênese (YEE et al., 2007).

Contudo, a MEC tumoral está frequentemente exposta a degradação por enzimas proteolíticas que favorece a progressão tumoral e desenvolvimento de metástases (LIOTTA; STEEG; STETLER-STEVENSON, 1991). O próprio VCAN também está sujeito a proteólise por atividade de proteases, como as da família de desintegrinas e metaloproteinases com domínios trombospondinas (ADAMTS) (KENAGY; PLAAS; WIGHT, 2006). Essas enzimas têm participação chave no remodelamento da matriz, principalmente em eventos associados a invasão e proliferação, e são responsáveis por gerar subprodutos de versican, denominados versikina (VKIN) (BINDER et al., 2017). Recentemente, estudos apontaram o possível papel imunomodulatório de VKIN em pacientes com mieloma múltiplo (HOPE et al., 2016), mas se sabe sobre esse proteólito nos carcinomas da mama.

Dessa forma, a hipótese do presente estudo é que a proteólise de versican na matriz extracelular está diretamente relacionada a invasividade, agressividade tumoral e com as alterações morfológicas da matriz extracelular nos carcinomas mamários. Para isto, foram avaliadas a expressão de versican, presença de versikina e a degradação da matriz extracelular nos carcinomas *in situ* e invasores da mama, além de verificar a relação destas moléculas com os subtipos moleculares e parâmetros clínico-patológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o termo que engloba subtipos de lesões malignas que surgem na glândula mamária de mulheres e mais raramente homens. Suas etiologias ainda são pouco compreendidas, e consideram fatores genéticos, hormonais e ambientais (ANGAHAR, 2017). Entre os fatores de risco para o câncer de mama estão: os endócrinos ou relativos à história reprodutiva, como menarca precoce ou nuliparidade; fatores comportamentais ou ambientais, como obesidade, consumo de bebida alcoólica; além de fatores genéticos e hereditários, como mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, supressores de tumor que perdem suas funções nos dois alelos ao sofrerem mutações na linhagem germinativa (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

2.1.1 Epidemiologia do Câncer de Mama

No último levantamento epidemiológico conduzido por Bray e colaboradores (2018), a partir dos dados disponibilizados pela *Internacional Agency for Research on Cancer* (IARC) GLOBOCAN 2018, foram analisados 36 tipos de câncer em 185 países e observou-se que, na maioria destes, o câncer de mama foi o tipo de câncer mais frequente. Em 2018, o câncer de mama foi o segundo tipo de tumor mais incidente em todo o mundo, atrás apenas do câncer de pulmão (Figura 1). Entre as mulheres, é o tipo de câncer mais incidente, além de ser a principal causa de morte por câncer, representando aproximadamente 2,1 milhões de casos e 627 mil mortes (WHO, 2018).

No Brasil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama representa o tipo mais incidente entre as mulheres. Estima-se 66.280 mil novos casos no país e risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres para cada ano de 2020 a 2022. Na Bahia, estimou-se para o ano de 2020 taxa bruta de incidência de 43,84 (3.460 casos) por 100 mil habitantes no estado e para a capital Salvador uma taxa bruta de incidência de 74,64 por 100 mil habitantes (1.180 casos) (INCA, 2019).

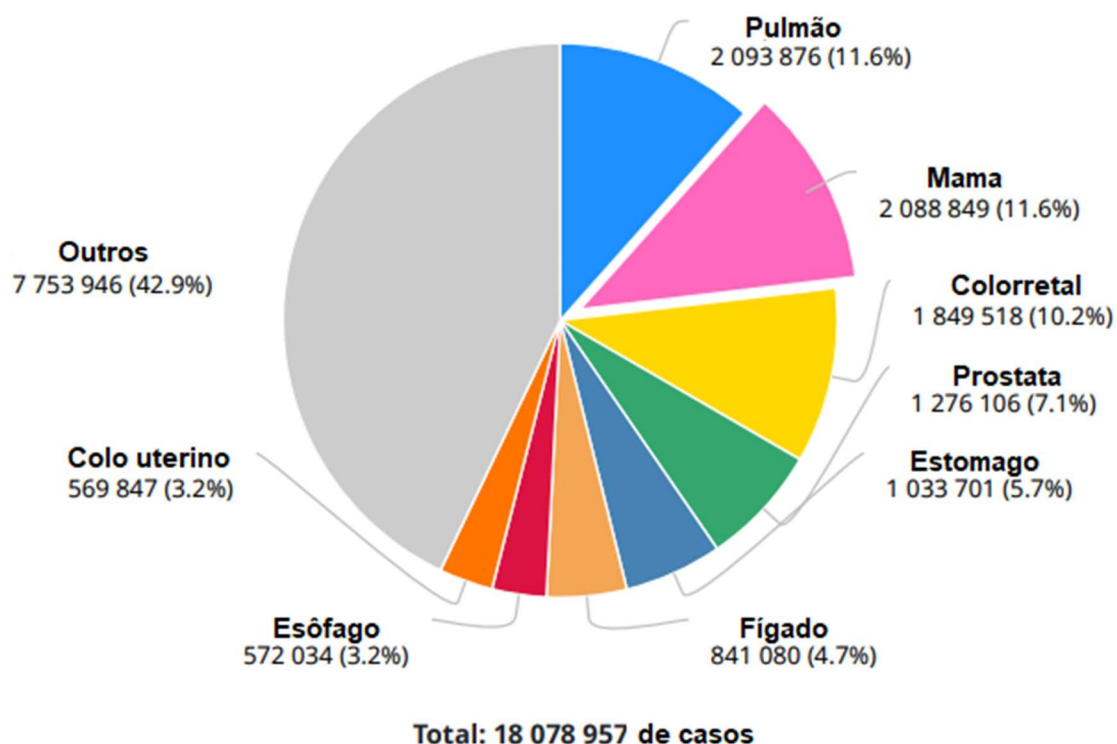


Figura 1. Número de novos casos de câncer para 2018 no mundo para ambos os sexos independentemente da idade. Fonte: adaptado de GLOBOCAN (WHO, 2018).

2.1.2 Carcinomas ductais *in situ* e carcinomas invasivos

Entre as teorias de evolução das lesões na mama, o modelo estabelecido por Wellings e Jensen ainda aceito por alguns especialistas (WELLINGS; JENSEN, 1973). Sugere-se que o carcinoma invasivo mamário surge a partir de uma única célula neoplásica localizada na unidade ducto-lobular terminal e dá origem aos estágios iniciais ou pré-malignos da maioria dos tumores ductais e lobulares, ou seja, não apresentam as características de invasão e metástase. Desse modo, progressões histológicas contínuas e progressivas dão origem a lesões invasivas (WELLINGS; JENSEN, 1973). Estes estágios nos carcinomas ductais incluem atipias epiteliais planas que sofrem alterações até darem origem as hiperplasias ductais atípicas e por fim o carcinoma ductal *in situ*, estágio que antecede a invasão (SGROI, 2009; ALLRED, 2010; COLEMAN, 2019).

Anteriormente, os CDIS que representavam 2-3% de todos os casos de câncer de mama nos Estados Unidos, porém a aplicação da mamografia no diagnóstico precoce revelou cerca de 20-25% (KERLIKOWSKA, 2010). Ainda existem discussões quanto a classificação dos CDIS. Estes tumores eram classificados como comedo, sólido, cribriforme, micropapilar ou papilar e o grau nuclear em conjunto ou não com necrose e/ou polarização celular também foram acrescentados a classificação. Histologicamente, os CDIS caracterizam-se pelo aumento da proliferação de células epiteliais com graus variados de atípias (baixo, intermediário e alto) restrito no ducto da glândula mamária, limitado por células mioepiteliais e membrana basal rica em laminina. O grau de atipia nuclear é, portanto, importante avaliação prognóstica para as lesões *in situ*. Apesar das células revelarem características malignas, elas não apresentam características de invasão, denotando um bom prognóstico para os CDISs (SGROI, 2009; LAKHANI et al., 2012; COLEMAN, 2019).

Durante a progressão neoplásica, a membrana basal é progressivamente degradada por metaloproteinases, as células epiteliais malignas perdem a polaridade apico-basal fazendo com e invadem o estroma, dando origem aos carcinomas invasores (KAI; DRAIN; WEAVER, 2019). Sendo assim, os CDISs exibem evidências de que são os precursores dos ductais invasores. (BUERGER et al., 1999; MARDEKIAN; BOMBONATI; PALAZZO, 2016). No entanto, já se sabe que essa progressão não é obrigatória e ainda não se sabe o por que e a frequência em que os CDISs progredem para carcinomas invasivos (COWELL et al., 2013; CASASENT; EDGERTON; NAVIN, 2017).

Os carcinomas invasores são responsáveis por 23% dos tumores de mama, incluindo os tipos especiais. Fatores como idade, tamanho tumoral, alto grau nuclear, comedonecrose e margem positiva tem sido associados a progressão do CDIS para os invasores. Estas lesões caracterizam-se, de modo geral, por alta taxa de infiltração no estroma. Os tumores podem estar arrançados em cordões, agregados ou trabéculas. Predominantemente, exibem padrão sólido ou padrão infiltrativo sincicial com pouco estroma associado, além disso focos de necrose também são observadas. Em 80% dos casos, essas lesões possuem componente ainda *in situ* associados. São tumores agressivos e com taxa de sobrevida de 30-50% em 10 anos. O prognóstico pode ser influenciado por grau histológico, tamanho tumoral, invasão dos linfonodos ou vascular e marcadores preditivos determinados pelos subtipos moleculares (LAKHANI et al., 2012).

Além disso, os tumores epiteliais que não se enquadram em uma das variantes histológicas são denominados carcinomas invasivos sem outra especificação (CDI-SOE), conhecido anteriormente como carcinoma ductal invasivo. Dessa forma, é um grupo heterogêneo que não possuem características histológicas semelhantes entre si e correspondem ao maior grupo entre os carcinomas invasivos (CSERNI, 2020). Os tumores invasivos que possuem padrões histológicos definidos são classificados como especiais, por exemplo os ricos em lipídios, rico em glicogênio, sebáceo, lobular invasor, tubular, cribriforme, entre outros. Esses tumores possuem características clínicas, epidemiológicas e moleculares particulares. Existem também outros carcinomas considerados raros, como as neoplasias neuroendócrinas, mioepiteliais, do tipo glândula salivar, papilares e suas variantes, entre outros (HOON TAN et al., 2020; CSERNI et al., 2020).

2.2 SUBTIPOS MOLECULARES DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS

Devido a heterogeneidade dos tumores de mama, estudos de expressão gênica estratificaram os tumores de acordo o perfil de expressão gênica, sendo denominados como subtipos moleculares. Estes subtipos já estão bem estabelecidos na literatura médica e na rotina oncológica, sendo dessa forma de suma importância para o manejo clínico-terapêutico (SØRLIE et al., 2001, 2003; NIELSEN et al., 2004; BLOWS et al., 2010; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

Inicialmente, Perou e colaboradores (2000) propuseram a subdivisão dos carcinomas mamários em: luminal A, que tem receptor de estrógeno positivo (RE+), receptor de progesterona positivo (RP+) e HER-2 negativo; luminal B que apresentam RE+, RP±, HER-2±; superexpressão de HER-2 que são positivos apenas para HER-2; Triplo-negativos, que apresentam RE-, RP-, HER-2-, *basal-like* ou não basal.

O subtipo luminal A caracteriza-se pela presença dos receptores de estrógeno (RE) e/ou de progesterona (RP), ausência de HER-2 e índice de proliferação (Ki-67) inferior a 14%. Este subtipo representa cerca de 30-40% dos carcinomas invasivos da mama e são o de melhor prognóstico comparado aos demais devido a sua similaridade com células da mama normal e normalmente apresentam grau I ou II (SØRLIE et al., 2001; SOTIRIOU et al., 2003; GOLDHIRSCH et al., 2013; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

O subtipo luminal B representa 20- 30% dos casos de carcinomas invasivos da mama, distingue-se do luminal A pelo índice proliferativo, medido por Ki-67 $\geq 14\%$. Existe um subgrupo do luminal B com HER+ que se diferencia do anterior pela presença de HER-2. Este subtipo revela alto grau histológico, elevada taxa de proliferação e prognóstico significativamente pior quando comparado aos tumores luminal A (SØRLIE et al., 2001; CHEANG et al., 2009; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; GOLDBHIRSCH et al., 2013; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

Diretrizes que apoiam a implementação da análise molecular do câncer de mama, estabelecidos por Perou (2000) e Sørli (2001), vem sendo publicados por importantes instituições, como a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e o Consenso Internacional de Especialistas de St. Gallen Group, e são importantes guias para o manejo clínico-terapêutico das pacientes. Em 2013, o consenso de St. Gallen incluiu a avaliação do Ki-67 (marcador de proliferação celular) na classificação dos subtipos. Este marcador está presente em todas as fases ativas do ciclo celular, exceto na fase G0, e é utilizado para a distinção entre os subtipos Luminal A e Luminal B HER-2-, sendo o Luminal B subtipo de maior índice de proliferação em relação ao Luminal A. O ponto de corte para a avaliação de Ki-67 nos subtipos moleculares mudou ao longo do tempo. Atualmente, a análise de marcação imuno-histoquímica de Ki-67 é feita pela contagem dos núcleos marcados e o índice de proliferação varia entre os laboratórios, sendo classificado em baixo quando Ki-67 $< 14-20\%$ e alto quando Ki-67 $\geq 14-20\%$ (GOLDBHIRSCH et al., 2011, 2013; COATES et al. 2015; NAHED; SHAIMAA, 2016).

O subtipo superexpressão de HER-2 está associado a ausência dos receptores hormonais e presença de HER-2. Segundo Sorlie e colaboradores (2001), é considerado o segundo subtipo de pior prognóstico, entretanto existe imunoterapia alvo com anticorpos se ligam ao domínio extracelular do receptor e, conseqüentemente, inibe o crescimento das células (Trastuzumabe). A superexpressão de HER-2 está associado ao aumento da agressividade do tumor, recidiva e mortalidade em pacientes com linfonodos já acometidos (KRISHNAMURTI; SILVERMAN, 2014).

O subtipo triplo-negativos dos carcinomas mamários não expressam RE, RP e HER-2, o que confere ausência de resposta das pacientes às terapias alvo para essas moléculas e é o subtipo de pior prognóstico. Histologicamente, esses tumores apresentam alto grau e altos índices mitóticos e extenso infiltrado inflamatório (HUDIS;

GIANNIB, 2011; PRAT et al., 2013). Previamente, os marcadores utilizados para avaliação do perfil triplo-negativo não permitiam uma estratificação específica para o grupo, dada a existência de diferenças entre o prognóstico e sobrevida das pacientes. Diante disso, são utilizados marcadores citoqueratina 5/6 (CK 5/6) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para a estratificação dos tumores *basal-like*, de acordo com observações na assinatura genética dos tumores triplo-negativos. Esses tumores foram denominados basais, uma vez que a camada basal da mama também possui alta expressão de citoqueratinas (CK 5/6, CK14 e CK17) e EGFR, porém vale ressaltar que nem todos os tumores basais são triplo-negativos (NIELSEN et al., 2004; CHEANG et al., 2008; MILIOLI et al., 2017).

Após a incorporação dos marcadores Ck-5/6 e EGFR, presentes em células basais/mioepiteliais, o subtipo pode ser segregado em *basal-like* (CK-5/6+ e EGFR+) e não basal (CK-5/6- e EGFR-). Histologicamente, os tumores *basal-like* são de alto grau, com alta taxa mitótica e elevada relação núcleo-citoplasma, zonas necróticas centrais e áreas metaplásicas. Além disso, estes tumores tem baixa expressão do gene BRCA1, supressor de tumor fortemente associado ao câncer de mama (NIELSEN et al., 2004; FULFORD et al., 2006; CHEANG et al. 2008; BHARGAVA et al., 2008; WEIGEL et al. 2010; MILIOLI et al., 2017). Em uma coorte com mais de 4.000 cânceres de mama invasivos primários, Cheang e colaboradores (2008) analisaram dois painéis imuno-histoquímicos, um deles utilizando apenas HER-2, RE e RP (triplo-negativos) e outro com acréscimo de CK 5/6 e EGFR (*basal-like*), e associaram os resultados ao desfecho clínico. O grupo mostrou que incluir os marcadores EGFR e CK 5/6 para o subtipo basal foi possível segregar os casos triplo-negativos em grupos de alto e baixo risco, sendo o pior prognóstico associado ao subconjunto de tumores positivos para os marcadores basais.

Os subtipos moleculares descritos acima não estão presentes apenas em carcinomas invasores, mas também são observados nos CDIS, embora apresente particularidades. O subtipo luminal B e superexpressão HER-2 foram mais frequentes nos CDIS em relação aos invasores, em contrapartida os tumores invasores obtiveram maior frequência de luminais A em relação aos *in situ*. Além disso, os tumores *in situ* de baixo grau apresentam fenótipos luminais e os de alto grau estão associados ao fenótipo basal (TAMIMI et al., 2008). Uma coorte de 458 casos diagnosticados como CDIS realizada por Zhou e colaboradores (2013), evidenciou a frequência de luminal A (48,8%), luminal B / HER2- (8,7%), 74 Luminal B / HER2 + (17,4%), 61 HER-2+ /

ER- (16,0%) e Triplo-negativo (7,1%). Entretanto, apenas RE está validado na prática clínica, porém ainda é pouco compreendido (LAKHANI et al. 2012).

Kennecke e colaboradores (2010) associaram os subtipos moleculares a padrões distintos quanto a metástases e viram diferenças na sobrevida das pacientes em análise. Foi observado um tempo de 2,2 anos para o subtipo luminal A, 1,6 para o luminal B, 1,3 no subtipo luminal B HER-2+, 0,7 no superexpressão de HER-2, e 0,5 anos no subtipo basal-like. Outro estudo conduzido por Voduc e colaboradores (2010), mostrou que os tumores Luminal A apresentavam menor taxa de recidiva. Os subtipos superexpressão de HER-2 e basail-like, quando não submetidos a cirurgia, bem como os subtipos luminal B, luminal-HER-2+, após a mastectomia, foram associados a um aumento do risco de recidiva.

Também foi identificado o subtipo *claudin-low*, que representam um dos subtipos moleculares de câncer de mama originalmente identificado pelo perfil de expressão gênica em análises de tumores de mama humanos e murinos. Este subtipo caracteriza-se pela expressão diminuída dos genes tais como as claudinas 3, 4 e 7, ocludina e E-caderina, além da expressão de genes relacionados a transição epitélio-mesênquima, como vimentina, marcadores endoteliais e de células tronco tumorais, com fenótipo CD44+/CD24- (*cluster of differentiation 44*). Histologicamente estes tumores apresentam alto grau histológico, extenso infiltrado linfocitário e margens tumorais circunscritas. Clinicamente, apresentam um prognóstico ruim e sobrevida global baixa quando comparado as pacientes do subtipo luminal A, entretanto possuem baixo índice de recidiva. Apesar dos esforços em caracterizar este subtipo molecular, ainda não existem evidências que justifiquem o uso desta classificação na rotina (HERSCHKOWITZ et al., 2007; PRAT et al., 2015).

Um estudo de coorte com 2 mil mulheres com câncer de mama do grupo METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) revelou, a partir de uma análise integrada do número de cópias e expressão gênica, dez subtipos com comportamentos clínicos distintos que foram denominados grupamentos integrativos (CURTIS et al., 2012; DAWSON et al., 2013). Uma análise mais recente, a partir do banco de dados disponibilizado pelo METABRIC, explorou a relação entre os parâmetros clínico-patológicos tradicionais do câncer de mama e os dez subgrupos, revelando que maioria dos carcinomas triplo-negativos e basais pertenciam ao subgrupo 10, que está associado à maior instabilidade genética e uma parte estava no subgrupo 4, que mostra baixa instabilidade genômica e extenso

infiltrado inflamatório (MUKHERJEE et al., 2018). Essa nova estratificação dos tumores da mama ainda não é usada na rotina oncológica.

2.3 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (MEC) compõe-se de moléculas secretadas por células epiteliais, fibroblastos, células imunes e células endoteliais. No geral, é composta por colágenos, elastina, lamininas, fibronectina, glicoproteínas, proteoglicanos e enzimas de remodelação. Entretanto sua composição e estrutura varia de tecido para tecido (HALPER; KJAER, 2014; THEOCHARIS et al., 2016).

A MEC pode ser dividida em dois grupos: matrizes intersticiais e pericelulares. A matriz intersticial é a mais abundante, circunda as células e é composta principalmente de colágeno I e fibronectina. As pericelulares são mais compactas que a matriz intersticial e consiste principalmente de colágenos IV, XV e XVIII, laminina, nidogênio e perlecan. A membrana basal é um tipo de matriz extracelular pericelular (BONNANS et al., 2015).

Além de funcionar como suporte e sustentação aos tecidos, a MEC também regula processos celulares, como crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese a partir da interação dessa rede macromolecular com receptores de superfície celular, tais como integrinas, receptores do fator de crescimento epidérmico, CD44, entre outros (THEOCHARIS et al., 2016).

2.3.1 Matriz extracelular no câncer de mama

Diversos estudos sobre o microambiente tumoral sugerem um importante papel da MEC no desenvolvimento e progressão do câncer de mama. A MEC tumoral pode ser um importante alvo terapêutico, devido à forte influência na progressão e desenvolvimento de metástases (DU et al., 2013; JENA; JANJANAM, 2018). O estroma mamário nos carcinomas, quando comparado a mama normal, exibe um aumento de fibroblastos, colágeno I, deposição de fibrina e torna-se fibrótico, além da alta liberação de enzimas proteolíticas que promovem o remodelamento da matriz. Esses elementos em conjunto alteram a rigidez da MEC ao longo da progressão

neoplásica e favorece a invasão das células cancerígenas pelo estroma (ARENDR, et al., 2011; LOPEZ, et al., 2011; THEOCHARIS et al., 2016).

Um estudo conduzido por McDaniel e colaboradores (2006), observou que o estroma de ratas em involução induzida por desmame promove a invasão de células tumorais, ao contrário da matriz mamária de ratas nulíparas. Os dados obtidos neste estudo condizem com os dados de altas taxas de metástases do câncer de mama associados à gravidez (LORD et al., 2009). Uma vez que o estroma mamário pós lactacional apresenta alta atividade de metaloproteinases, deposição de colágeno fibrilar, proteólito de fibronectina e laminina, além de alta expressão de ciclooxigenase-2, tornando-se semelhante ao estroma cicatricial que, conseqüentemente, contribui para a disseminação de células tumorais durante a invasão (MCDANIEL et al., 2006; LYONS et al., 2011).

Em condições normais, células do estroma, como os fibroblastos, contribuem para a manutenção dos tecidos pela secreção contínua dos componentes da MEC. Os fibroblastos normais podem se transformar em fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e contribuir para a progressão, metástases e resistência terapêutica do câncer de mama através da secreção de hormônios, citocinas e fatores de crescimento, influenciando comportamento das células neoplásicas (WANG et al., 2017; JENA; JANJANAM, 2018). Yu e colaboradores (2014) demonstraram que a secreção de TGF- β pelos CAFs diminuíram a adesão, aumentaram a migração e invasão de células neoplásicas da mama dos subtipos luminal A (MCF-7 e T47D) e *basal-like* (MDA-MB-231), promovendo a transição epitélio-mesênquima.

A transição epitélio-mesênquima também pode ser estimulada por outros mecanismos desencadeados pela matriz extracelular. Zhang e colaboradores (2013) propuseram que a DDR2 (receptor contendo domínio de discoidina 2) presente em células mesenquimais estimula a atividade de ERK2 (quinases reguladas por sinal extracelulares), ao se ligar aos colágenos I e II, e fosforila o Snail1 levando ao acúmulo nuclear do Snail1. Desta forma, a interação entre receptor e moléculas da matriz contribui para a invasão e migração de células neoplásicas (ZHANG, 2013).

Em um estudo recente quanto as características morfológicas da matriz extracelular nos subtipos histológicos, no qual os carcinomas foram agrupados de acordo com a deposição de colágeno na matriz extracelular, observou-se que o grupo A, com maior quantidade, uniformidade e organização de colágeno intratumoral, correspondeu aos carcinomas lobulares e tubulares invasivos, o grupo B, com essas

mesmas características classificadas como intermediárias, correspondeu aos carcinomas invasivos sem tipo especial, metaplásicos, apócrinos invasivos e micropapilares, e o grupo C, com menor quantidade, uniformidade e organização de colágeno intratumoral, correspondeu aos carcinomas medulares, mucinosos e papilares. Os carcinomas invasivos sem tipo especial foram encontrados nos três grupos apresentados acima. Esses dados sugerem a heterogeneidade dos carcinomas invasivos da mama quando as características morfológicas do estroma (NATAL et al., 2019).

Estudos também têm mostrado que a degradação da matriz está relacionada ao desfecho clínico de pacientes com câncer de mama. Bergamaschi e colaboradores (2008) estratificaram tumores da mama de pacientes com base nos padrões dos componentes da MEC e observaram que existiam diferenças significativas no desfecho clínico entre os grupos determinados no estudo, sugerindo que os tumores de mama podem ser classificados com base na sua composição. O grupo nomeado MEC4 apresentou superexpressão de inibidores de protease e teve um desfecho favorável. Por outro lado, os tumores do grupo MEC1, os quais apresentaram superexpressão de integrinas e metalopeptidases e baixa expressão de várias cadeias de laminina, tiveram pior prognóstico.

2.3.1.1 Proteoglicano Versican

VCAN é um proteoglicano de sulfato de condroitina pertencente a subfamília das hialectinas que está presente nos tecidos, desde a embriogênese nos tecidos cardíaco, vascular, neural, pele, cartilagem e vasos. É estruturalmente composto por domínios ativos terminais: G1 ou globularamino-terminal que se liga ao ácido hialurônico (AH); o domínio G3 ou carboxi-terminal que possui domínios do tipo selectina, o domínio lectina tipo C, dois domínios do fator de crescimento epidermal (EGF) e uma região que regula o complemento (DOURS-ZIMMERMANN; ZIMMERMANN, 1994; WU et al., 2005; RAHMANI et al., 2006). Adicionalmente, possui o domínio central que é composto por glicosaminoglicanos (GAG's) α e β . O splicing alternativo dos exons 7 e 8, que codificam os GAG's α e β , pode dar origem a cinco isoformas do proteoglicano versican, identificadas como V0, V1, V2, V3 e V4 (Figura 2). A isoforma V0 é a maior entre todas e caracteriza-se pela presença de

todos os domínios, incluindo o GAG- α e GAG- β . V1 caracteriza-se pela presença de apenas um domínio GAG- β , enquanto a isoforma V2 apresenta somente o domínio GAG- α e a isoforma V3 não possui nenhum dos dois sítios de ligação aos GAG's (DOURS-ZIMMERMANN; ZIMMERMANN, 1994; ZAKO et al., 1995). Já V4 foi descrita pela primeira vez em câncer de mama humano, essa isoforma expressa apenas parte do domínio GAG- β e é secretada por fibroblastos em resposta ao TGF- β 1 (KISCHEL et al., 2010).

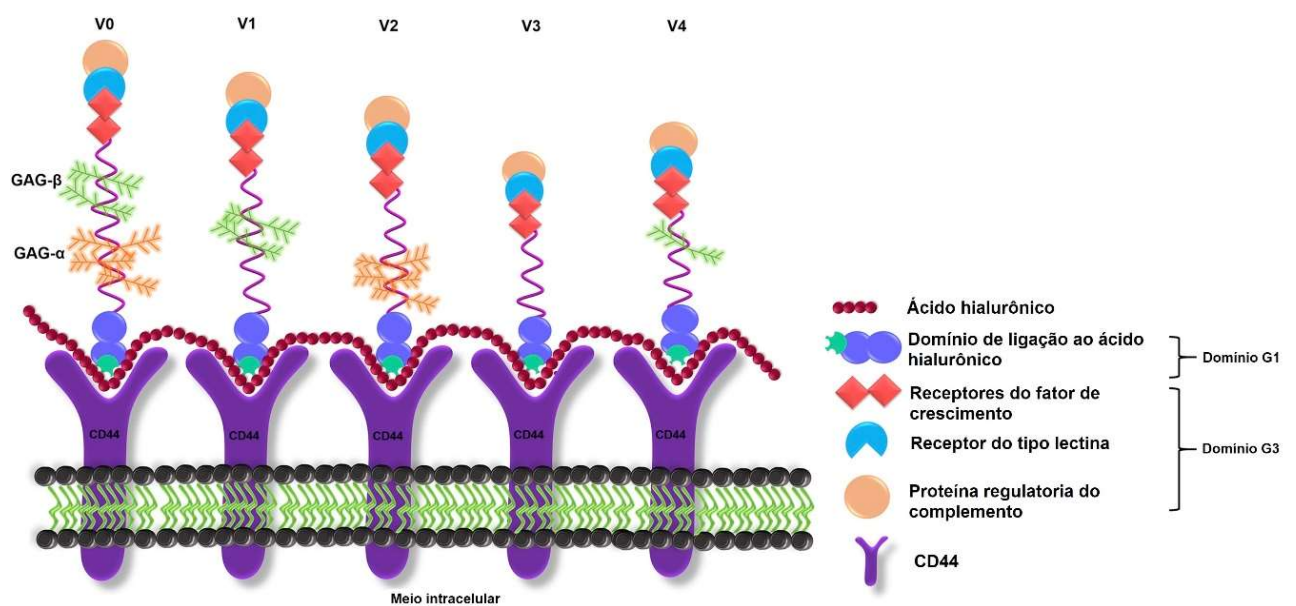


Figura 2. Isoformas de Versican. Fonte: adaptado de BINDER et al., 2017.

VCAN pode estar associado diretamente ou indiretamente com várias moléculas incluindo tenascina, fibulina-1, fibrilina, fibronectina, CD44, EGFR, L-selectina e β 1-integrina que em condições normais desempenham papéis importantes para a integridade, adesão celular e proliferação das células do tecido (WIGHT, 2002; WU, 2004; WU et al., 2005). No contexto tumoral, a expressão dos proteoglicanos é desregulada (THEOCHARIS et al., 2015). Estudos têm mostrado que VCAN encontra-se superexpresso em estroma peritumoral e está relacionado ao comportamento agressivo de tumores de mama, como aumento da proliferação celular, perda de adesão das células, motilidade e invasão celular no estroma, angiogênese e inflamação (NARA et al. 1997; RICCIARDELLI et al., 2009; SUWIWAT et al. 2004; YEE et al., 2007; WIGHT et al., 2020).

Um estudo em tumor de mama mostrou que VCAN está presente adjacente às áreas ricas em ácido hialurônico (AH) e em regiões de proliferação celular, sugerindo a associação entre VCAN e invasão ao estroma (NARA et al., 1997). A motilidade e aumento da proliferação das células neoplásicas podem ser compreendidas pela ligação do VCAN com o AH que interagem com receptor de superfície celular CD44 e com EGFR, por meio dos motivos EGF localizados no domínio G3. A partir desta interação, mecanismos de sinalização intracelular são desencadeados os quais regulam a multiplicação e migração das células neoplásicas na MEC (MIQUEL-SERRA et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2011a; WEEN; OEHLER; RICCIARDELLI, 2011; DU; YANG; YEE, 2013).

Nesse contexto, estudos exploram a influência de VCAN na transição epitélio-mesênquima no microambiente tumoral, importante evento para o estabelecimento de metástases. Dados mostram que VCAN em modelo de tumor de mama espontâneo, foi secretado por células mieloides antes do desenvolvimento da metástase no pulmão, induzindo a transição mesênquima-epitélio de células tumorais metastáticas, proporcionando o estabelecimento destas células no sítio metastático (GAO et al., 2012). Esses dados corroboram com a teoria semente e solo, proposta em 1889 por Steven Paget (PAGET, 1889). Além disso, Zhang e colaboradores (2019) recentemente mostraram que a menor expressão de VCAN diminui a migração celular induzida pela via Snail, relacionada a transição epitélio-mesênquima, em células MCF 10A, linhagem de células de câncer de mama.

O proteoglicano VCAN também parece ser um importante regulador do microambiente inflamatório, pois a inflamação frequentemente é acompanhada de altos níveis de VCAN no câncer. A interação de VCAN com células inflamatórias também acontece por meio da ligação com AH ou diretamente por meio de receptores, como CD44, P-selectina e receptores toll-like (TLRs) presentes nessas células, ativando a síntese e secreção de citocinas inflamatórias, além de influenciar no fenótipo das células imunes (WIGHT et al., 2020). Além disso, Pappas e colaboradores (2018) mostraram que no mesotelioma no modelo murino, a deficiência de VCAN por silenciamento, resultou na diminuição de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, além de promover a polarização de macrófagos para o M1. Acredita-se que os macrófagos M1, que possuem um papel antitumoral, aumentou a fagocitose e estímulos apoptóticos, resultando na diminuição do crescimento do tumor observada no estudo.

Além disso, um estudo conduzido por Du e colaboradores (2013) revelou que o silenciamento da expressão VCAN também inibe a renovação de células neoplásicas da mama. Em contrapartida, a superexpressão do domínio G3 aumentou esta reposição celular por meio da sinalização EGFR/AKT/GSK-3 β , além de estabelecer maior resistência à quimioterápicos (DU et al., 2013). Esses dados somados aos anteriores reforçam a importância de estudos que elucidem os mecanismos relacionados ao proteoglicano versican na progressão do câncer de mama.

2.3.2 Degradação da matriz extracelular câncer de mama

As enzimas modificadoras da MEC, como metaloproteinases de matriz, heparanase, catepsinas, ativador de plasminogênio uroquinase e enzimas de reticulação da família da lisil oxidase, podem estar altamente expressas nos tumores de mama. Estas enzimas podem expor sítios que interagem com células neoplásicas e dessa forma contribuem significativamente para a progressão e metástase no câncer de mama (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016).

Acredita-se que o aumento da atividade da lisil oxidase (LOX), aminoxidase dependente de cobre que inicia a reticulação do colágeno, em condições de hipóxia, tem a regulação da sua expressão alterada em vários tipos de neoplasias, incluindo de mama, cabeça e pescoço. A LOX é considerada um marcador de mau prognóstico, sendo relacionada a indução de metástases (LE et al., 2009; ERLER et al., 2006). Além da atividade de LOX, o tecido também sofre enrijecimento pela atividade da enzima prolil hidroxilase, que tem transcrição aumentada nas neoplasias pelo fator induzível por hipóxia, promovendo o aumento da deposição de colágeno e o alinhamento das células de invasão ao longo das fibras de colágeno enrijecidas, resultando em maior invasão e metástase para os linfonodos e pulmões (HU; LI; XU, 2017).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) também tem destaque no remodelamento da matriz durante o câncer. Acredita-se que a membrana basal, que é abundantemente composta por colágeno IV, pode ser degradada principalmente por MMP-2 e MMP-9, passo importante para a invasão de células em proliferação *in situ* (DUFFY et al., 2000).

Em contrapartida, a alta expressão de TIMP (inibidores teciduais de metaloproteinases) tem efeito protetor, atenuando a atividade de MMPs (WANG et al., 1997; YONEDA et al., 1997; RADISKY; RAEESZADEH-SARMAZDEH; RADISKY,2017). Diante disso, existem estudos que consideram o possível papel terapêutico desse inibidores direcionados seletivamente as MMPs responsáveis pela progressão do tumor (RADISKY; RAEESZADEH-SARMAZDEH; RADISKY, 2017). No entanto, a transferência de genes TIMP-4 aumentou o crescimento de tumores em um modelo ortotópico de câncer de mama, o que pode ser explicado pelo seu poder de inibir a apoptose em células de câncer de mama humano *in vitro* e *in vivo* (JIANG et al., 2001).

Os proteoglicanos presentes na MEC também estão sujeitos a degradação no microambiente tumoral. A família das ADAMTS (metaloproteinases com domínios trombospondinas), que pode ter sua atividade desregulada no contexto do câncer, participam da degradação destes elementos da MEC, gerando proteólitos, e dessa forma contribuindo para importantes eventos de progressão da doença (KELWICK et al., 2015; BINDER et al., 2017).

2.3.2.1 ***Proteólise do proteoglicano versican***

Os proteoglicanos hialectano, tais como VCAN, sofrem constantes clivagens por proteoglicanases, como as ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 e -20, MMPs e plasmina. Estas clivagens normalmente ocorrem em processos do desenvolvimento embrionário, como a compactação das fibras miocárdicas, o fechamento do palato secundário, a miogênese, a regressão interdigital demonstrada em camundongos, entre outros (KENAGY; PLAAS; WIGHT, 2006; MCCULLOCH et al., 2009; NANDADASA; FOULCER; APTE, 2014; KELWICK et al., 2015).

O desequilíbrio entre os proteoglicanos hialectanos e as enzimas ADAMTS tem sido visto como importante fator na progressão neoplásica. Fragmentos mais bem descritos contêm o domínio G1 e são gerados pela clivagem de GAG- β das isoformas V0 e V1. Como resultado da clivagem por ADAMTS na ligação Glu⁴⁴¹-Ala⁴⁴², no domínio GAG- β da isoforma V1, surge o proteólito bioativo G1-DPEAAE⁴⁴¹, denominado versikina (VKIN) (SANDY et al., 2001; NANDADASA;FOULCER; APTE, 2014) esquematizado na Figura 3.

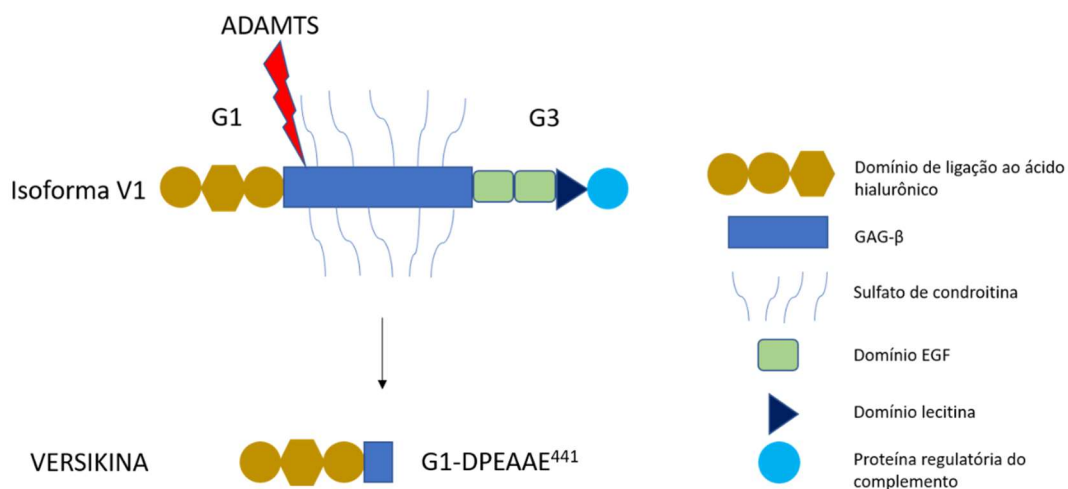


Figura 3. Clivagem da isoforma V1 de versican dando origem a versikina.

VKIN é um fragmento de VCAN que desempenha atividade diferente da molécula inteira e, assim como VCAN, ela também é importante no desenvolvimento embrionário. Além disso, pesquisas mais recentes têm relacionado VKIN a processos de modulação da resposta imunológica no microambiente tumoral. (NANDADASA; FOULCER; APTE, 2014; HOPE et al., 2016; TIMMS; MAURICE, 2019).

Em mieloma, Hope e colaboradores (2016) notaram que ADAMTS1 derivado de células presentes no estroma era responsável pela degradação de VCAN (isoforma V1) produzida por macrófagos intratumorais, gerando a VKIN. Em seguida, estes autores expuseram células CD14+ à VKIN e observaram que ela foi capaz de induzir a secreção de citocinas inflamatórias IL-1 β (interleucina-1 β) e IL-6 (interleucina-6), sugerindo que VKIN adquire papel de DAMP no microambiente tumoral. Já no carcinoma colorretal, uma forte correlação também foi observada entre a proteólise VCAN e infiltrado de células T CD8 + intratumorais. Adicionalmente, os dados mostraram que VKIN promove a diferenciação de células dendríticas Batf3 na medula óssea, o que implica no aumento do infiltrado intratumoral de células T CD8 + (HOPE et al., 2017), esses dados reforçam o papel deste proteólito como imunomodulador da resposta imune.

Recentemente, Dhakal e colaboradores (2019) mostraram que a proteólise de VCAN promove o recrutamento de células T CD8 + em paciente com mieloma após transplante, e essa resposta acaba sendo prejudicial a sobrevida desses pacientes,

sugerindo VKIN como um biomarcador que indica recidiva e baixa sobrevida nesses tumores. Presumivelmente, de acordo com os trabalhos de Hope e colaboradores (2016; 2017) e Dhakal e colaboradores (2019), VKIN tem um papel imunomodulador no câncer, entretanto mais estudos são necessários a fim de elucidar melhor esses achados.

A presença de VKIN também foi relatada em leiomioma uterino (GUEYE et al., 2017) e cultura de células de câncer de mama e pulmão (ASANO et al., 2017). De acordo com Asano e colaboradores (2017), VKIN possui um papel independente de VCAN na angiogênese, uma vez VKIN estava localizado nas células endoteliais, enquanto VCAN estava localizado na ao redor dos vasos de tumores derivados de linha celular de mama e pulmão em camundongos. Mais estudos são necessários para elucidar a participação de VKIN na angiogênese.

Existem outros fragmentos derivados de VCAN. A proteína de ligação ao ácido hialurônico glial (GHAP) provem das isoformas V0 e V2 na ligação Glu405–Gln406 e foi encontrada em tecido neural. Ela também parece participar da modulação da resposta imunológica, contudo mais estudos são necessários para desvendar o papel da GHAP na resposta inflamatória (PAPADAS et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar as modificados na matriz extracelular dos tipos histológicos e moléculas e sua relação com versican e versikina nos carcinomas mamários.

3.2 ESPECÍFICOS

- (I) Avaliar os fatores clínico-patológicos, tais como TNM, IPN, metástase e grau histológico das pacientes em estudo e correlacionar os achados com os fatores prognósticos estudados;
- (II) Avaliar a expressão de versican e versikina em estroma adjacente às áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras nos carcinomas mamários;
- (III) Identificar alterações morfológicas no estroma adjacente às áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras em carcinomas mamários;
- (IV) Avaliar a relação entre imunomarcção de versican, versikina e as alterações morfológicas em estroma adjacente a proliferação neoplásica com os subtipos moleculares dos carcinomas invasores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESPÉCIMES MAMÁRIOS

Para realização deste estudo, foi feito um levantamento de aproximadamente 400 casos a partir do arquivo digital do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Édgar Santos (HUPES/UFBA), utilizando o descritor “Mama”. Como critérios de inclusão foram considerados casos diagnosticados como carcinomas ductais *in situ* ou invasores, independente da raça e maiores de 18 anos, com peças cirúrgicas de mulheres previamente submetidas ao tratamento cirúrgico (mastectomia; quadrantectomia; setorectomia ou tumorectomia) em blocos de parafina no período de 2001 a 2017. Foram excluídos casos que não foram encontrados blocos de parafina ou com material insuficiente e que tiveram diagnósticos diferentes após a análise retrospectiva por um patologista sem acesso aos laudos histopatológicos. Cento e vinte casos foram carcinomas ductais *in situ* e carcinomas invasores e após aplicar os outros critérios de inclusão e exclusão, trinta e sete blocos de parafina estavam disponíveis e elegíveis para a realização da análise retrospectiva (Figura 4). Adicionalmente, foram coletados cinco espécimes mamários em blocos de parafina correspondentes glândula normal de mulheres que também submetidas a tratamento cirúrgico com carcinomas mamários.

A avaliação incluiu: idade ao diagnóstico inicial; etnia/cor autodeclarada; tipo do tumor primário; tamanho do tumor; *status* do linfonodo; estadiamento anatomopatológico e prognóstico; presença ou ausência de invasão vascular linfática ou sanguínea e necrose; grau histológico de Nottingham, e índice prognóstico de Nottingham de acordo com os dados acessados nos prontuários médicos e reanálises.

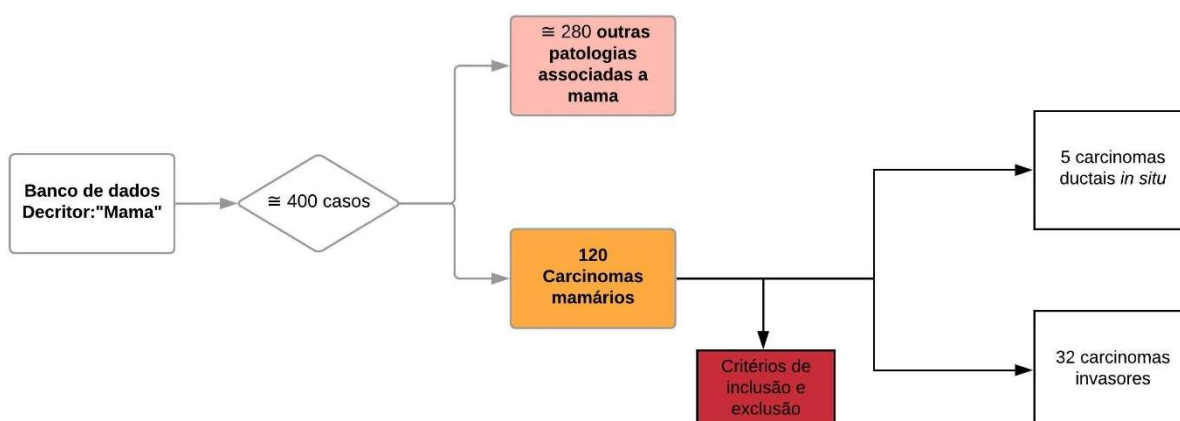


Figura 4. Seleção dos casos e espécimes mamários.

4.2 CLASSIFICAÇÃO TNM PARA TUMORES MALIGNOS

Foram obtidos dados de estadiamento anatomopatológico e prognóstico com base no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), grau histológico e status de expressão dos biomarcadores receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico-2 (HER-2) de acordo com a oitava edição do sistema TNM para neoplasias mamárias estabelecido pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) (AMIN, et al. 2017). Os dados de tamanho, envolvimento neoplásico de linfonodos regionais e presença de metástase foram obtidos dos laudos histopatológicos de cada paciente. O status de expressão dos biomarcadores RE, RP e HER-2 foram obtidos posteriormente por imuno-histoquímica de acordo com os itens 4.6 e 4.6.1.

4.3 HISTOPATOLOGIA

Após a seleção dos casos, os blocos de parafina foram encaminhados para microtomia. Secções histológicas de 4µm foram obtidas dos fragmentos mamários e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. A reclassificação histopatológica dos casos foi realizada por um segundo patologista de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para as neoplasias mamárias (WHO, 2019). Os casos foram categorizados de acordo com o diagnóstico histopatológico para a realização das análises. Os carcinomas ductais *in situ* (CDIS) puros corresponderam ao Grupo 1 (G1), os carcinomas invasores sem outra especificação (CI-SOE) ao grupo G2, os CI-SOE com áreas *in situ* associadas correspondeu ao grupo G3. Outros tumores foram reclassificados como papilar sólido, adenóide cístico e tubular invasor e corresponderam ao G4 nas análises.

4.4 GRAU HISTOLÓGICO

Para classificar o grau histológico quanto os critérios do Sistema de Nottingham foram observados formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica nas áreas de invasão (ELSTON; ELLIS, 1998). As estruturas tubulares apresentam lúmen claro e visível. Tumores com mais de 75% da área carcinomatosa formada por túbulos correspondem ao escore 1 neste primeiro parâmetro; escore 2 entre 10% e 75% e escore 3 entre 0 e 10%. O pleomorfismo nuclear corresponde ao tamanho e forma dos núcleos das células tumorais e o parâmetro utilizado são as células normais adjacentes ao tumor. Núcleos pequenos e regulares com cromatina uniforme foram classificados como escore 1 para este segundo parâmetro, núcleos de tamanho maior e com variabilidade na forma foram considerados escore 2 e células com grande variação no tamanho e forma do núcleo (bizarros, e com múltiplos nucléolos) foram considerados escore 3. O terceiro parâmetro é o de contagem mitótica e foi realizado por dois patologistas de forma individualizada com o microscópio Nikon Eclipse E200 com ocular de 10x e objetiva de 40x com diâmetro 0,49 mm que fornece área de 0,19 mm² visualizada em campo de maior aumento (CGA). As figuras mitóticas foram contadas em 10 CGA, selecionados preferencialmente na periferia do tumor onde se

observa maior atividade de proliferação celular (ELSTON; ELLIS, 1998). O escore da contagem mitótica foi dado pelo número de figuras mitóticas contadas em 10 campos. Quando encontradas de 0 a 8 mitoses o escore foi 1, de 9 a 16 mitoses o escore foi escore 2 e acima de 17 mitoses o escore foi escore 3.

Para a obtenção do grau histológico do tumor, o escore de cada um dos parâmetros foi somado e de acordo com o total que varia de 3 a 9 o grau tumoral é dado baseado na tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Grau Histopatológico de Nottingham.

Pontos	Grau
3 – 5	grau I – baixo grau
6 – 7	grau II – grau intermediário
8 – 9	grau III – alto grau

Além disso, os carcinomas ductais *in situ* foram classificados quando ao grau nuclear. Os CDISs de alto grau apresentam núcleos grau 3 e com mitoses frequentes, os CDISs de grau intermediário apresentam núcleos e taxa mitótica intermediária entre o alto e baixo grau, enquanto os CDISs de baixo grau apresentam nuclear de grau 1 ou baixa taxa mitótica (LAKHANI et al., 2012).

4.5 ÍNDICE PROGNÓSTICO DE NOTTINGHAM (IPN)

O Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) é utilizado para prever a sobrevivência de pacientes com câncer de mama primário em que seja possível a exérese cirúrgica (ELSTON; ELLIS, 1998). No presente estudo, este índice foi calculado segundo o tamanho do nódulo (cm), escore do linfonodo e graduação definido pelo sistema de Nottingham de acordo com a seguinte equação:

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

Quanto maior for o IPN pior será o prognóstico de acordo com a tabela 2 (ELSTON; ELLIS, 1998).

Tabela 2. Valores de IPN e prognóstico correspondente.

Pontos	Grau
< 3,4	I - Bom prognóstico
3,41 - 5,4	II- Prognóstico moderado
> 5,41	III - Prognóstico ruim

4.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a imunomarcção, utilizou-se os anticorpos primários listados na tabela 3.

Tabela 3. Lista de anticorpos com suas respectivas marcas e diluição adotada.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição
Versican	12C5	DShB	1:50
Versikina	Policlonal	ThermoFisher Scientific	1:500
EGFR	31G7	LSbio	1:100
HER-2	Policlonal	Dako	1:200
Ki-67	Mib-1	Dako	1:50
RE	ER ID5	Dako	1:50
RP	PgR636	Dako	1:50
CK5/6	D5/6B4	Dako	1:50
P63	4A4	Neomarkers	1:80

Para a realização da técnica, secções de 4µm foram obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas silanizadas (*StarFrost*). As lâminas foram desparafinizadas, re-hidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos e submetidas à

recuperação antigênica em calor úmido (panela de pressão elétrica a 95° por 20 minutos) com tampão citrato (*Target Retrieval Solution*), pH 6.0, exceto as lâminas destinadas a marcação de VCAN, VKIN e EGFR. Nestas, foram realizados tratamentos enzimáticos por meio de condroitinase ABC, citrato-EDTA e proteinase K, respectivamente. Posteriormente todas as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com soro normal de coelho a 10% em PBS por 15 minutos.

As secções histológicas foram incubadas com o anticorpo primário por 1 hora a 25°C 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 e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Como controles positivos foram usadas amostras de glândula mamária previamente testadas. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

4.6.1 Avaliação imuno-histoquímica

A reatividade para p63 foi indicada pela presença de marcação nuclear em células mioepiteliais no intuito de confirmar as áreas carcinomatosas *in situ* e ausência de marcação nas áreas de invasão (BARBARESHI et al. 2001).

As avaliações das imunomarcações de VCAN e VKIN foram feitas no estroma adjacente às áreas carcinomatosas *in situ* e invasora, bem como no citoplasma destas células malignas. As avaliações destes marcadores foram feitas de forma semiquantitativa baseado no sistema de escore proposto por Skandalis et al. (2011) adaptado por Damasceno et al. (2012) o qual inclui a porcentagem total de tecido marcado pelo anticorpo e evidenciado pela DAB (0-100%) e a intensidade de marcação. Foi utilizada a escala, (1) quando negativo ou fracamente marcado, (2) positivo fraco, (3) positivo moderado e (4) positivo forte (APÊNDICE A). Os níveis de marcação de VCAN e VKIN foram dados pela multiplicação da totalidade do tecido marcado (0-100%) pela intensidade (1-4).

A atividade proliferativa das células foi determinada pelo percentual de núcleos marcados com Ki-67 entre 1.000 células tumorais (DOWSETT et al., 2011). Para a marcação de RE e RP, entre 1 a 100% dos núcleos tumorais marcados são

interpretados como positivo de acordo com a *American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists (ASCO/CAP)* (ALLISON et al., 2020).

As expressões HER-2 e EGFR foram analisadas segundo *American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists (ASCO/CAP)*, no qual somente são considerados positivos casos em que possuem marcação membranar completa e intensa em pelo menos 10% das células epiteliais malignas (escore 3+) (WOLFF et al., 2018). CK-5/6 foi considerado positivo quando observada coloração citoplasmática e/ou membranar (fraca a forte) (NIELSEN et al. 2004; ABDELRAHMAN et al. 2017). Para a classificação do perfil molecular dos casos, foram utilizados os critérios de classificação adotados por Tang et al. (2016) em que no subtipo luminal A, os receptores de estrógeno (RE) e/ou de progesterona (RP) são positivos, HER-2 negativo e índice de proliferação (Ki-67) é inferior a 20%; o luminal B distingue-se do luminal A pelo índice proliferativo Ki-67 $\geq 20\%$. O *cut-off* de Ki-67 para diferenciar os subtipos luminal A e B foi o mesmo utilizado por BULBUL e colaboradores (2019). Além disso, foi classificado um subgrupo do luminal B que se diferencia do anterior pela presença de HER-2. O subtipo de superexpressão de HER-2 foi dado pela negatividade para RE e RP e positividade apenas para HER-2; os tumores triplo-negativos foram considerados quando não houve expressão dos receptores hormonais nem de HER-2. Neste foram incorporados os marcadores para citoqueratina 5/6 (Ck-5/6) e o EGFR, expressos em células basais/mioepiteliais, e assim o subtipo foi segregado em basal-like, os que possuem Ck-5/6 e EGFR e não basal que não expressam esses genes (tabela 4).

4.7 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Após a análise imuno-histoquímica de VCAN e VKIN, foi observado um extenso infiltrado inflamatório próximo as áreas *in situ* dos carcinomas ductais *in situ*. No intuito de avaliar uma possível correlação entre a proteólise e o infiltrado linfocítico, foi realizada uma análise semi-quantitativa desse infiltrado nos CDIS de acordo com Dieci et al. (2018).

Tabela 4. Classificação dos subtipos moleculares de acordo com o padrão de marcação imuno-histoquímico.

SUBTIPO MOLECULAR	PADRÃO DE IMUNOMARCAÇÃO
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <20%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥20% RE+ e /ou RP+, HER2+ (Luminal HER2)
Superexpressão de HER-2	RE-, RP-, HER2+
Basal-like	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basal	RE-, RP-, HER2-, CK5- e/ou EGFR-

4.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR

Foram realizadas colorações especiais como Tricrômico de Masson para visualização das fibras colágenas em azul (SUN et al., 2018) e Picrosirius Red que pela birrefringência das fibras de colágeno permite a visualização das fibras do tipo I (cor vermelha) e tipo III (cor verde) (DRAFKA et al. 2016).

Foram capturados 10 campos das áreas adjacentes a proliferação maligna *in situ* e 10 campos de áreas invasoras a partir das lâminas coradas com Tricrômico de Masson e Picrosirius Red. Para a coloração Picrosirius Red foi utilizado o microscópio óptico invertido DMi8 Leica com objetiva de 10x, em campo claro e luz polarizada. Para a coloração Tricrômico de Masson foi utilizado o microscópio óptico LMD 6500 Leica com objetiva 10x. Os dados foram obtidos a partir da quantificação da área e intensidade de colágeno com o auxílio do software ImageJ, versão Fiji. Dessa forma, foi possível selecionar as áreas de colágeno pela definição de um pixel padrão que representasse a cor da coloração em cada fotomicrografia. Tendo como base o pixel padrão definido, a ferramenta seleciona todos os outros pixels similares respeitando um valor de tolerância previamente configurado. Uma vez selecionada a área de colágeno, para as imagens de Tricrômico de Masson foram obtidos os valores de área

da região marcada em micrômetros e a intensidade de coloração, em uma escala de 0 a 255. Para Picosirius Red foram obtidos somente os valores de área do colágeno tipo I e tipo III em micrômetros como exemplificado na Figura 4.

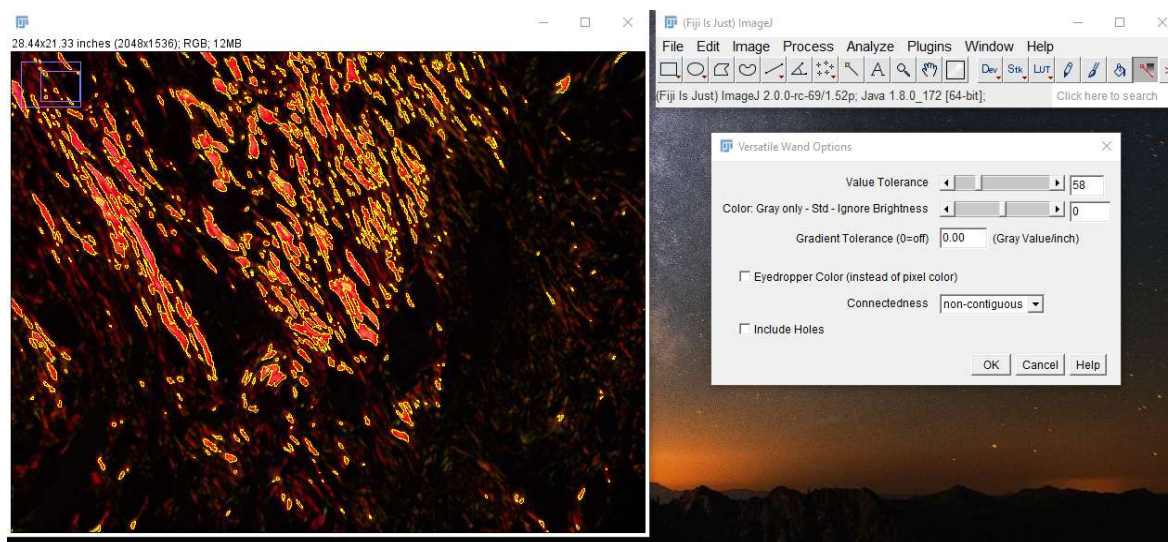


Figura 5. Seleção de área de colágeno tipo I. Coloração Picosirius Red em luz polarizada.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FIOCRUZ/IGM (CAAE 65210017.9.0000.0040). A presente proposta consiste num estudo retrospectivo, sendo assim os métodos utilizados para as avaliações não causaram prejuízos as pacientes, além daqueles inerentes aos procedimentos usuais para o diagnóstico da doença.

4.9 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. Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson, além da análise de regressão linear. Para avaliar diferenças entre a mama normal, áreas in situ e invasoras e os grupos morfológicos dos carcinomas mamários, foram utilizados os testes t ou *Ordinary one-way ANOVA*.

Foram consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste for $p < 0,05$. As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Grap Pad Instat v. 7.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A média das idades entre as mulheres foi de 53,5 anos, variando entre 32 e 85 anos. De acordo com os prontuários médicos, a cor autorreferida mais frequente foi parda (24/37; 64,9%). A cirurgia mais frequente foi a mastectomia (24/37; 65,5%) e a maioria dos tumores eram >2,0 e ≤5,0 cm (15/32; 46,9%). Esses dados não revelaram correlação com a presença de VCAN e VKIN (APÊNDICE B).

Tabela 5. Características da população de estudo.

CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	N/total (%)
Idade (média)	53,5 anos
COR	
Parda	24/37 (64,9)
Negra	7/37 (18,9)
Branca	1/37 (2,7)
Não declarada	5/37 (13,5)
Cirurgia	
Mastectomia	24/37 (65,5)
Setorectomia	3/37 (8,1)
Quadrantectomia	10/37 (2,7)

5.2 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

Entre os casos diagnosticados como carcinomas invasores, 56,25% tiveram metástase para linfonodo (18/32), sendo que 46,9% (15/32) dos casos tiveram entre 1-3 linfonodos acometidos. Em nenhum dos casos foi reportada metástase a distância.

A realização do estadiamento anatômico dos casos invasores (n=32) revelou que o estadio II foi o mais frequente (18/32; 56,25%), seguido pelos estadio III (10/32; 31,25%) e estadio I (4/32; 12,5%). De forma semelhante, a análise do estadiamento prognóstico revelou que o estadio II foi o mais frequente (13/32; 40,6%), seguido do

estadio III (11/32; 34,4%) e estadio I (8/32; 25%). Dessa forma, quatro casos passaram de estadio anatômico II para estadiamento prognóstico I e um caso passou de estadio anatômico II para estadio prognóstico III.

Na graduação histológica de Nottingham dos casos invasores, 71,9% (23/32) dos casos foram classificados como grau III (considerados pouco diferenciados), seguido do grau II (moderadamente diferenciados) (7/32; 21,9%) e grau I (bem diferenciados) (2/32; 6,2%). Quanto aos casos puramente *in situ*, observou-se que 80% (4/5) dos casos apresentaram alto grau e 20% (1/5) apresentaram baixo grau.

No Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) dos casos invasores foi observado que 59,4% (19/32) dos casos tinham índice prognóstico intermediário (IPN II: 3,41-5,4), 25% (8/32) bom índice prognóstico (IPN I: < 3,4), e 15,6% (5/32) apresentaram um índice prognóstico ruim (IPN III: > 5,41).

Quanto a presença ou ausência de necrose, na análise geral dos casos foi observado que 46% (17/32) dos casos apresentaram necrose. Enquanto na análise dos carcinomas invasores foi observado que 37,5% (12/32) dos casos apresentaram invasão vascular linfática.

Após a reclassificação dos casos e agrupamento, levando em consideração os grupos histológicos, os CDIS (grupo G1) corresponderam a 13,5% (5/37) (Figura 6a); CI-SOE (grupo G2) 54,1% (20/37) dos casos (Figura 6b); CI-SOE associado a CDIS (grupo G3) com 21,6% (8/37); e por fim tumores diagnosticados como papilar sólido, adenóide cístico e tubular invasor (grupo G4) com 10,8% (4/37).

Os casos que apresentavam invasão carcinomatosa foram classificados quanto ao subtipo molecular de acordo com os marcadores RE, RP, Ki-67, HER-2, CK5/6 e EGFR listados na tabela 5. A maioria foi classificada como Luminal A (40,6%; 13/32), seguido do Luminal B HER-2+ e Triplo Negativo (ambos 18,8%; 6/32), Luminal B (12,5%; 4/32) e por fim superexpressão de HER-2 (9,4%; 3/32). Os casos Triplo-negativos foram segregados em basal, representando 6,2% (2/32) e não basal com 12,5% (4/32) dos casos.

Todos os dados descritos acima estão detalhados na Tabela 5. As análises de correlação entre os fatores patológicos e a expressão de VCAN e VKIN estão apresentadas no APÊNDICE B.

Tabela 6. Características patológicas dos casos analisados.

CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS	N/total (%)
Tamanho do tumor	
≤2,0 cm	7/32 (21,9)
pT2 (> 2,0 x ≤5,0 cm)	15/32 (46,9)
pT3 (> 5,0 cm)	8/32 (25)
pT4 (parede torácica e/ou extensão da pele)	2/32 (6,2)
Metástase para linfonodos	
pN0 (nenhuma)	14/32 (43,75)
pN1mi (micro metástases)	0/32 (0)
pN1a (1-3 linfonodos)	15/32 (46,9)
pN2a (4-9 linfonodos)	1/32 (3,1)
pN3a (10 ou mais linfonodos)	2/32 (6,25)
Metástase a distância	
M0	32/32 (100)
M1	0/32 (0)
Estadio anatomopatológico	
I	3/32 (9,4)
II	19/32 (59,4)
III	10/32 (31,2)
IV	0/32 (0)
Estadio prognóstico	
I	9/32 (28,1)
II	12/32 (37,5)
III	11/32 (34,4)
IV	0/32 (0)
Grau histológico de Nottingham	
I	2/32 (6,2)
II	7/32 (21,9)
III	23/32 (71,9)
Índice prognóstico de Nottingham	
I	8/32 (25)
II	19/32 (59,4)
III	5/32 (15,6)
Grau nuclear dos CDIS	
Alto	4/5 (80)
Intermediário	0/5 (0)
Baixo	1/5 (20)
Diagnóstico histopatológico	
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	5/37 (13,5)
Carcinoma invasor sem outra especificação	28/37 (75,7)
Carcinoma papilar sólido <i>in situ</i> e invasor	2/37 (5,4)
Carcinoma adenóide cístico	1/37 (2,7)
Carcinoma tubular invasor	1/37 (2,7)

Grupos histológicos

G1 (CDIS)	5/37 (13,5)
G2 (SOE)	20/37 (54,1)
G3 (SOE + CDIS)	8/37 (21,6)
G4 (outros carcinomas invasivos)	4/37 (10,8)

Necrose

Positivo	17/37 (46)
Negativo	20/37 (54)

Invasão vascular linfática

Positivo	12/32 (37,5)
Negativo	20/32 (62,5)

Receptor de estrogênio

Positivo	19/32 (59,4)
Negativo	13/32 (40,6)

Receptor de progesterona

Positivo	21/32 (65,6)
Negativo	11/32 (34,4)

Ki-67

<20%	21/32 (65,6)
≥20%	11/32 (34,4)

HER-2

Positivo	9/32 (28,1)
Negativo	23/32 (71,9)

EGFR

Positivo	5/32 (15,6)
Negativo	31/37 (84,4)

CK-5/6

Positivo	0/32 (0)
Negativo	32/32 (100)

Subtipos moleculares

Luminal A	13/32 (40,6)
Luminal B	4/32 (12,5)
Luminal B HER-2+	6/32 (18,75)
Superexpressão de HER-2	3/32 (9,4)
Triple-negativo	6/32 (18,75)

5.3 AVALIAÇÃO DA PROTEÓLISE DE VCAN EM ESTROMA DA MAMA NORMAL E ADJACENTE ÀS ÁREAS CARCINOMATOSAS *IN SITU* E INVASORAS DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS

Na análise da expressão de VCAN em mama normal (n=5) (Figura 7c), foi observada expressão discreta em estroma adjacente às glândulas (Tabela 7; Figura 6a e 7d). A expressão de VKIN foi encontrada apenas no citoplasma de algumas células epiteliais normais (Figura 7g) e foi fraca na maioria dos casos. A presença de versikina foi negativa no estroma da mama normal.

Na análise geral dos casos, foi observada maior expressão de VCAN em estroma adjacente as áreas invasoras (Figura 7f) quando comparadas ao estroma adjacente a glândula mamária normal (p=0,0091) (Tabela 7; Figura 6a). Quanto a presença de VKIN, foi observada maior presença no estroma adjacente às áreas *in situ* (Figura 7h) (p=0,0005) e invasoras (Figura 7i) (p<0,0001) quando comparadas ao estroma da mama normal (Figura 7g) (Tabela 7; Figura 6b).

A expressão de VCAN em estroma adjacente as áreas carcinomatosas *in situ* foi correlacionada positivamente com a presença de VKIN no citoplasma das células neoplásicas (r=0,6536; p=0,0249) e em estroma nas áreas *in situ* (r=0,8735; p=0,0009) (Figura 8), assim como com sua expressão em estroma nas áreas de invasão (r=0,7444; p=0,0405). Além disso, foi observada uma correlação negativa moderada entre a expressão de VCAN no estroma das áreas *in situ* e invasão linfática (r= -0,6168; p= 0,026) (Tabela 9).

A presença de VKIN em estroma adjacente às áreas carcinomatosas *in situ* apresentou correlação positiva forte entre áreas de invasão (r=0,8222; p= 0,0167), bem como com a expressão citoplasmática em células invasoras (r= 0,8933; p= 0,0333). Além disso, a presença de VKIN no citoplasma das células carcinomatosas invasoras apresentou correlação positivamente moderada com a presença de EGFR (r=0,5243; 0,0147) e correlação positiva fraca com necrose (r=0,4997; p=0,0179). Os dados também revelaram uma correlação negativa fraca entre VKIN em estroma e mitose (r=-0,4177; p=0,0337) (Tabela 10).

Foi observado um extenso infiltrado inflamatório associado às áreas *in situ* dos CDIS e, diante disso, foi feita a contagem do infiltrado nessas áreas, porém o teste de correlação de Sperman não revelou correlações entre esse infiltrado e a presença de VCAN e VKIN nessas áreas (APÊNDICE C).

Tabela 7. Expressão de versican (VCAN) e versikina (VKIN) no estroma e citoplasma da mama normal (N) nas áreas *in situ* (IS) e áreas invasoras (IN) dos carcinomas mamários.

	Estroma			Citoplasma		
	N	IS	IN	N	IS	IN
VCAN (média±DP)	54±18	153±140	214±96	-	-	-
VKIN (média±DP)	0	128±67	139±64	116±49	103±89	97±65

DP= Desvio padrão. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN. Teste *Ordinary One Way ANOVA*. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p^* < 0.05$.

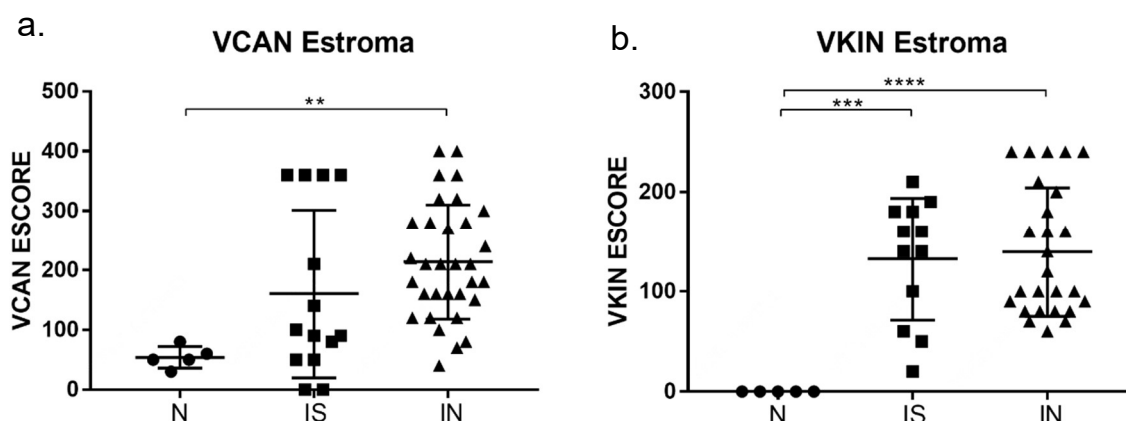


Figura 6. Diferenças na imunomarcção de versican (VCAN) e versikina (VKIN) no estroma das áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) dos carcinomas mamários e mama normal (N). (a) Maior expressão de VCAN nas áreas invasivas em relação a mama normal. (b) Maior expressão de VKIN no estroma contendo células invasoras e *in situ* comparado ao estroma da mama normal. Teste *Ordinary One Way ANOVA*. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $*p < 0,05$. $** p < 0,01$; $*** p < 0,001$; $**** p < 0,0001$.

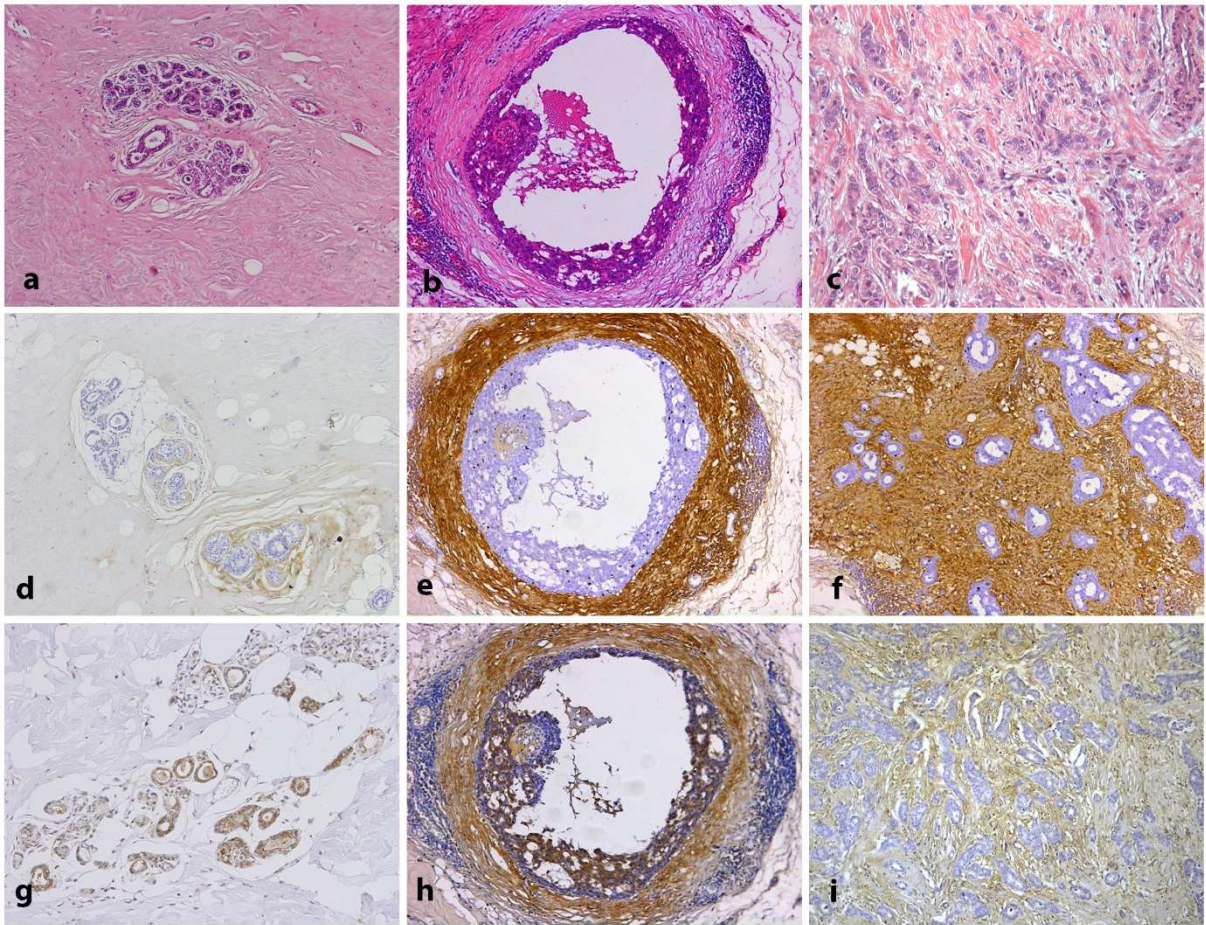


Figura 7. Imunomarcaco de versican e versikina nas áreas *in situ* e invasoras dos carcinomas mamários (a) Glândula mamária normal. HE, 10x. (b) Carcinoma ductal *in situ*. HE, 10x. (c) Carcinoma invasor (SOE). HE, 20x. (d) Imunomarcaco discreta e focal de versican no estroma adjacente as células epiteliais normais da mama. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 10x. (e) Carcinoma ductal *in situ* com forte expressão focal de versican no estroma adjacente. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 10x. (f) Expressão forte e difusa de versican em estroma adjacente células carcinomatosas invasoras. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's. 10x. (g) Imunomarcaco negativa de versikina no estroma adjacente as células epiteliais normais da mama e positiva no citoplasma dessas células. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 10x. (h) Forte e focal expressão de versikina em estroma adjacente a células carcinomatosas *in situ*. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 10x. (i) Expressão discreta e difusa de versikina no estroma adjacente às células invasoras de carcinoma invasor (SOE). Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's. 10x. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN.

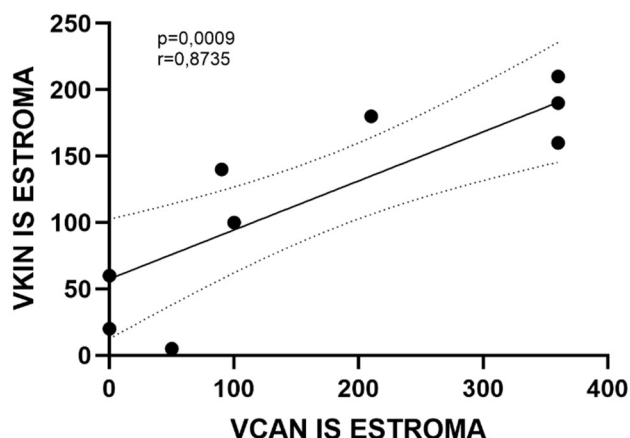


Figura 8. Versican e versikina apresentaram forte correlação positiva no estroma adjacente as proliferações carcinomatosas *in situ*.

5.4 RELAÇÃO ENTRE OS GRUPOS HISTOLÓGICOS E A PRESENÇA DE VERSICAN E VERSIKINA

Nos grupos histológicos com áreas *in situ* avaliados, foi observada maior expressão de VCAN em estroma adjacente as áreas carcinomatosas *in situ* no grupo G1 quando comparado com mama normal ($p=0,0070$) (Figura 9a), vale ressaltar que houve uma forte expressão de VCAN limitada as proximidades da membrana basal das áreas de proliferação *in situ* no grupo G1. As imunomarcações de VKIN em estroma das áreas *in situ* nos grupos G1 e G3 também foram maiores quando comparadas a mama normal ($p<0,0001$ e $p=0,0016$, respectivamente) (Figura 9b). Além disso, foram observadas maior presença de VCAN e VKIN quando estroma adjacente as áreas *in situ* do grupo G1 foi comparado as áreas *in situ* do grupo G3 ($p=0,0215$ e $p=0,0446$, respectivamente) (Figura 9a e 9c). G1 também mostrou maior expressão de VCAN e VKIN quando comparado as áreas *in situ* do G4 ($p=0,0403$ e $p=0,0072$, respectivamente) (Figura 9a e 9b).

A expressão de VCAN e a presença de VKIN em estroma contendo células de invasão também foi maior na maioria dos grupos em relação a mama normal. Essa diferença foi significativa entre a imunomarcação de VCAN no estroma da mama normal e G2 ($p=0,096$) e G3 ($p=0,0111$) (Figura 10a). Quanto a imunomarcação de VKIN nessas mesmas áreas, foi observada diferença entre mama normal e G2 ($p=0,0020$), G3 ($p<0,0001$) e G4 ($p=0,0037$) (Figura 10b). Quando os grupos G2 e G3

foram comparados quanto a expressão de VCAN e VKIN, foi observada maior expressão de VKIN no grupo G3 ($p=0,0148$) (Figura 10c) e não houve diferença quanto a expressão de VCAN nesses grupos. As médias da imunomarcação em cada um dos grupos estão na tabela 8.

Tabela 8. Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) estroma e citoplasma das áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) dos grupos histológicos.

	Estroma				Citoplasma	
	VCAN IS Média±DP (N/total)	VCAN IN Média±DP (N/total)	VKIN IS Média±DP (N/total)	VKIN IN Média±DP (N/total)	VKIN IS Média±DP (N/total)	VKIN IN Média±DP (N/total)
G1	298±98 (5/5)	-	185±18 (5/5)	-	106±75 (5/5)	-
G2	-	211±100 (20/20)	-	156±65 (16/20)	-	105±75 (15/20)
G3	102±90 (7/8)	230±106 (8/8)	114±57 (7/8)	180±70 (8/8)	111±95 (7/8)	81±38 (6/8)
G4	50 (2/4)	197±66 (4/4)	20 (1/4)	153±90 (3/4)	20 (1/4)	85±80 (3/4)

DP = desvio padrão. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN. G1 = CDIS; G2 = CI-SOE; G3 = CI-SOE com áreas *in situ*; G4 = outros carcinomas.

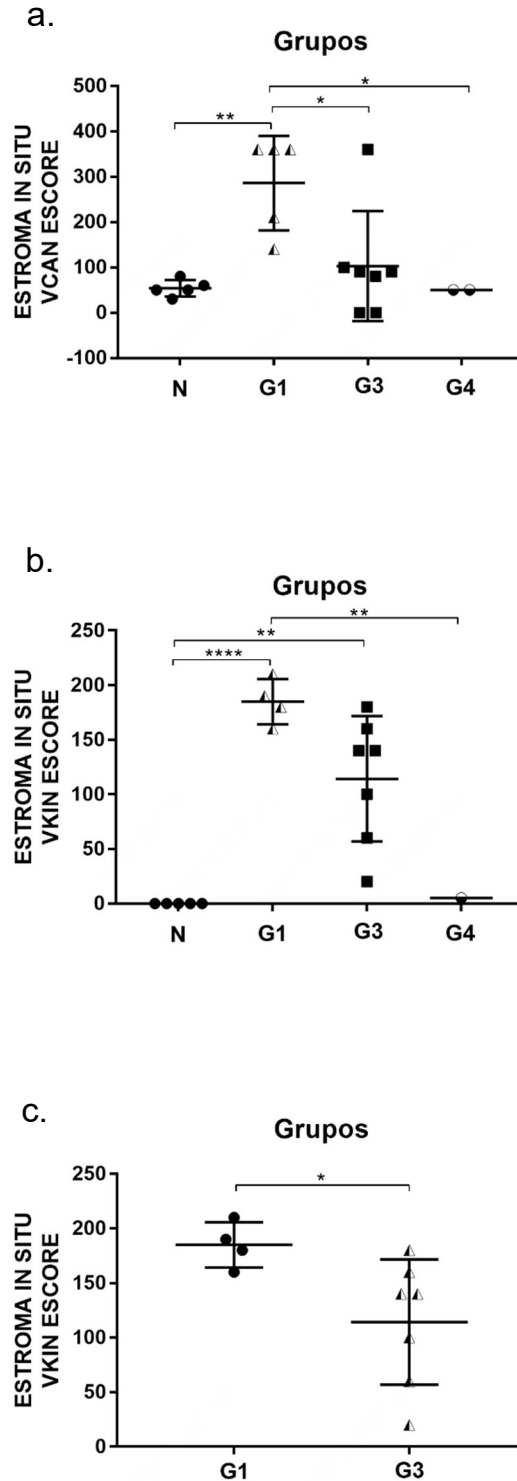


Figura 9. Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) no estroma da mama normal (N) e das áreas *in situ* (IS) dos grupos histológicos. (a) Expressão de VCAN no estroma da mama normal (N) e adjacente ao estroma de áreas de proliferação *in situ* do G1 (CDIS), G3 (CI-SOE com áreas *in situ* associadas) e G4 (outros carcinomas da mama). Teste *Ordinary one-way ANOVA*. (b) VKIN no estroma adjacente às áreas *in situ* do G1, G3 e G4. Teste *Ordinary one-way ANOVA*. (c) VKIN no estroma adjacente às áreas *in situ* do G1 e G3. Teste t não pareado. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN. As diferenças estatísticas foram consideradas quando * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.**

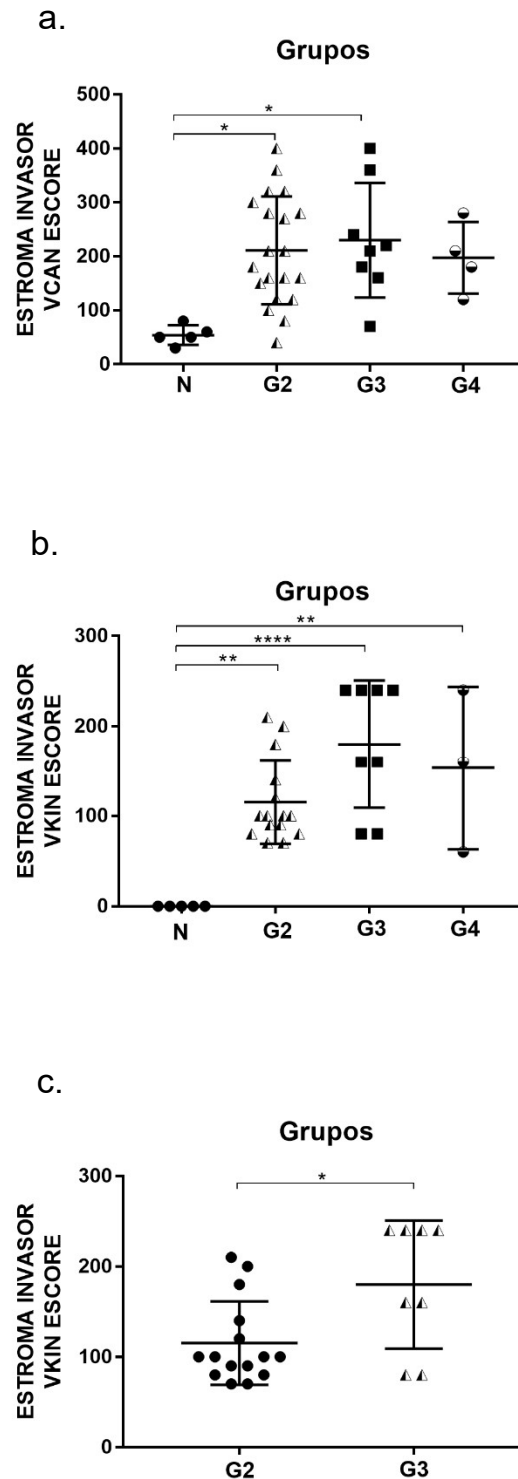


Figura 10. Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) no estroma da mama normal (N) e das áreas invasoras (IS) dos grupos histológicos. (a) VCAN no estroma da mama normal e no estroma de áreas contendo invasão no G2 (CI-SOE), G3 and G4. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. (b) VKIN no estroma da mama normal e no estroma de áreas contendo invasão do G2, G3 e G4. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. (c) VKIN no estroma de áreas contendo invasão do G2 e G3. Teste t não pareado. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN. As diferenças estatísticas foram consideradas quando * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.**

Na análise isolada do grupo G3, foi possível observar maior expressão de VCAN ($p=0,0497$) (Figura 11a) no estroma contendo células carcinomatosas invasoras quando comparado com o estroma adjacente às áreas *in situ*. A presença de versikina nessas áreas aparentemente também foi maior, porém não revelou diferença estatisticamente significativas (Figura 11b).

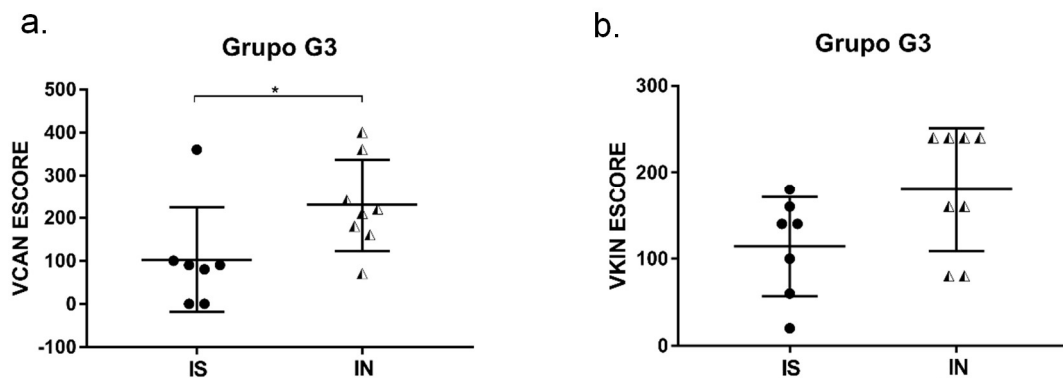


Figura 11. Análise de versican (VCAN) e versikina (VKIN) no estroma adjacente as áreas *in situ* (IS) invasoras (IN) dos carcinomas invasivos sem outra especificação com áreas *in situ* associadas (grupo G3). (a) Maior expressão de VCAN nas áreas invasoras em relação às áreas *in situ* do G3. Teste t não pareado. (b) Maior expressão de VKIN em áreas invasivas em comparação com áreas *in situ* do grupo G3. Teste t não pareado. Escore de 0 a 400 para VCAN e VKIN. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $*p < 0,05$.

5.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA MATRIZ EXTRACELULAR NOS CARCINOMAS MAMÁRIOS E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA EM ESTROMA E GRUPOS HISTOLÓGICOS

A avaliação morfológica da matriz extracelular em hematoxilina e eosina revelou que a desmoplasia estava presente na maioria dos casos analisados (67,6%; 25/37). A coloração especial Tricrômico de Masson foi realizada por quantificar a deposição de colágeno total pela intensidade densitométrica. Foi observado a presença de colágeno total em mama normal (média = 99 ± 13) (Figura 13a), em estroma adjacente às áreas *in situ* (média = 124 ± 28) (Figura 13b) e às áreas de invasão (média = 130 ± 19) (Figura 13c) dos carcinomas analisados. Apenas foi observada diferença estatística quanto a intensidade de colágeno total entre às áreas de estroma adjacente as células epiteliais normais e de células carcinomatosas invasoras ($p=0,0476$) (Figura 12).

A expressão de VCAN em estroma adjacente às áreas *in situ* revelou correlação negativa forte com desmoplasia ($r=-0,7084$; $p=0,0087$) e negativa moderada com a presença de colágeno total também nas áreas *in situ* ($p=0,0405$; $r=-0,5727$) (Tabela 9). Além disso, a presença de colágeno total nas áreas *in situ* apresentaram correlação negativa forte com VKIN nessas áreas ($r=-0,7317$; $p=0,0197$) (Tabela 10).

Os dados também revelaram uma correlação negativa fraca entre a expressão de VCAN e presença de colágeno total em estroma adjacente as células carcinomatosas invasoras ($r=-0,4595$; $p=0,0106$) (Tabela 9).

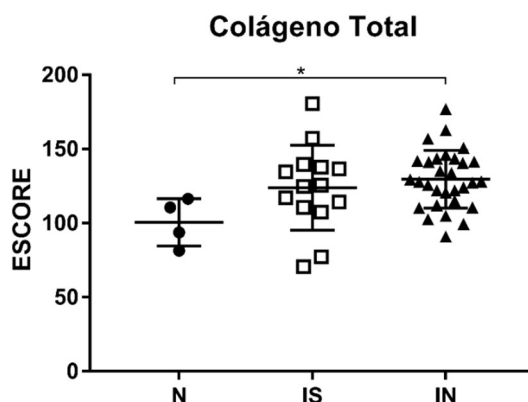


Figura 12. Colágeno total evidenciado pela coloração especial Tricrômico de Masson no estroma da mama normal (N), adjacente às áreas contendo células invasoras (IN) e *in situ* (IS) dos carcinomas mamários. Teste *Ordinary one-way*. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $*p < 0,05$.

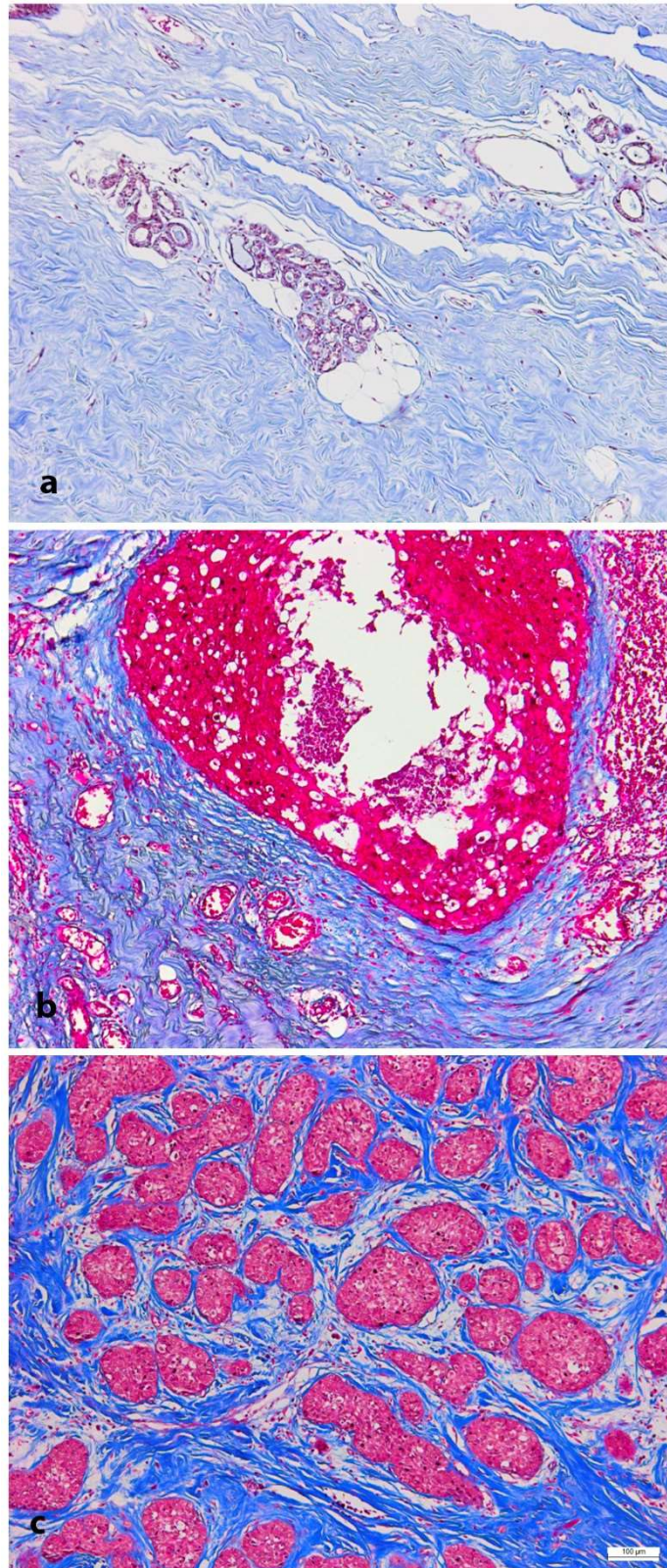


Figura 13. Colágeno total em azul evidenciado pela coloração Tricrômico de Masson. (a) Colágeno total em azul no estroma da mama normal. Tricômico de Masson, 10x. **(b)** Colágeno total no estroma adjacente a proliferação carcinomatosa *in situ*. Tricômico de Masson, 10x. **(c)** Colágeno total no estroma adjacente a células carcinomatosas invasoras. Tricômico de Masson, 10x.

Na análise da coloração especial Picrosirius Red (PR), com intuito de quantificar a deposição de colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde) em luz polarizada, foi observado que a intensidade de colágeno tipo I foi discretamente maior nas áreas de invasão em relação às áreas *in situ* e a mama normal apresentou predomínio do colágeno tipo I, mas esse dado não foi estatisticamente significativo (Figura 14a). Já o colágeno tipo III foi maior nas áreas *in situ* em relação às áreas de invasão ($p=0,0398$) (Figura 14b). A Figura 15 mostra as marcações dos colágenos I e III.

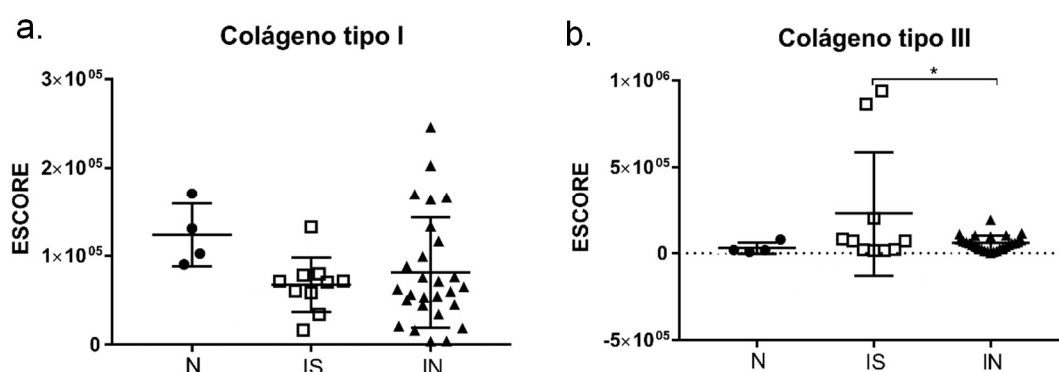


Figura 14. Colágeno tipo I e III evidenciados pela coloração Picrosirius Red (PR) no estroma da mama normal e adjacente às áreas *in situ* e que continham células invasoras dos carcinomas mamários. (a) Presença de colágeno tipo I na mama normal (N) e nas áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) dos carcinomas de mamários. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. (b) Presença de colágeno tipo III na mama normal e nas áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) dos carcinomas de mamários. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $*p<0,05$.

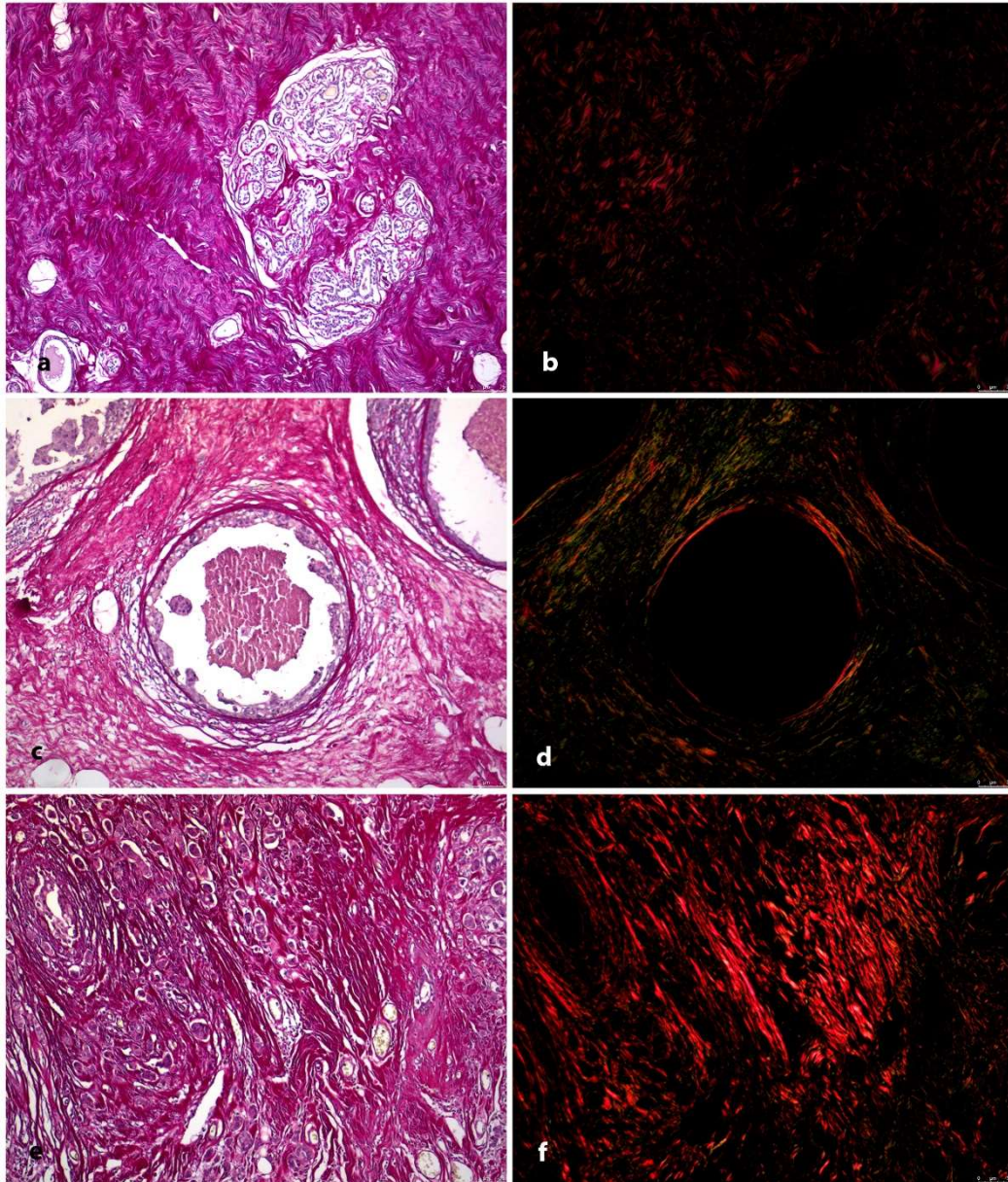


Figura 15. Colágeno tipo I e III evidenciados pela coloração Picrosirius Red em luz polarizada. (a) Coloração Picrosirius Red na mama normal em campo claro.10x. **(b)** Colágeno tipo I (vermelho) no estroma da mama normal em luz polarizada. Picrosirius Red, 10x. **(c)** Coloração Picrosirius Red no estroma adjacente a proliferação carcinomatosa *in situ* da mama,10x. **(d)** Predomínio de Colágeno tipo III (verde) no estroma adjacente a proliferação carcinomatosa *in situ* da mama. Picrosirius Red, 10x. **(e)** Coloração Picrosirius Red no estroma adjacente a células carcinomatosas invasoras da mama,10x. **(f)** Predomínio de Colágeno tipo I (vermelho) no estroma adjacente as células carcinomatosas invasoras da mama. Picrosirius Red, 10x.

Além disso, foi observado uma correlação negativa forte entre a presença de colágeno tipo I e VCAN em estroma adjacente às áreas *in situ* ($r=-0,7669$; $p=0,0137$) (Tabela 9). Isso também foi observado entre colágeno tipo I e VKIN nas áreas *in situ* ($r=-1$; $p=0,0167$) e nas áreas invasoras ($r=-0,9747$; $p=0,0333$) (Tabela 10).

Com relação aos grupos histológicos em estudo, foi observada maior presença de colágeno total nas áreas de invasão dos grupos G2 ($p=0,0341$) e G3 ($p=0,0467$) quando comparados a mama normal (Figura 16a), essas diferenças não foram observadas entre mama normal e às áreas *in situ*. Já o colágeno tipo I foi maior em mama normal quando comparada com às áreas *in situ* dos grupos G1 ($p=0,0043$) e G3 ($p=0,0330$) (Figura 16b), bem como entre mama normal e as áreas de invasão do grupo G2 ($p=0,0083$) (Figura 16c). Quanto ao colágeno tipo III nas áreas de invasão, foram observada maior deposição no grupo G3 em relação a mama normal ($p=0,0444$) e G2 ($p=0,0444$) (Figura 16d). As áreas *in situ* do grupo G1 obtiveram maior presença de colágeno tipo III em relação a mama normal e as áreas *in situ* de G3, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 9. Correlações entre versican (VCAN) no estroma adjacente às áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) e versikina (VKIN), deposição de colágeno e invasão vascular.

	VCAN IS (estroma)	VCAN IN (estroma)
VKIN IS (citoplasma)	r= 0,6536 p= 0,0249	r= 0,3735 p= 0,3615
VKIN IS (estroma)	r= 0,8735 p= 0,0009	r= 0,5749 p= 0,1433
VKIN IN (estroma)	r= 0,7444 p= 0,0405	r= 0,3069 p= 0,1272
Colágeno total IS	r= -0,5727 p= 0,0442	r= -0,2008 p= 0,6034
Colágeno total IN	r= -0,4051 p= 0,2797	r= -0,4595 p= 0,0106
Colágeno tipo I IS	r= -0,7669 p= 0,0137	r= -0,2052 p= 0,7667
Invasão vascular	r= -0,6168 p= 0,026	r= 0,03574 p= 0,844

Correlação de Spearman. O valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

Tabela 10. Correlações entre versican (VCAN) no estroma e citoplasma de células das áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) e versikina (VKIN), colágeno, EGFR, mitose e necrose.

	VKIN IS (estroma)	VKIN IN (estroma)	VKIN IS (citoplasma)	VKIN IN (citoplasma)
VKIN IS (estroma)	-	r= 0,8222 p= 0,0167	r= 0,4346 p= 0,1577	r= 0,8933 p= 0,0333
Colágeno total IS	r= -0,7317 p= 0,0197	r= -0,5006 p= 0,2179	r= -0,1876 p= 0,5781	r= -0,0303 p > 0,9999
Colágeno tipo I	r=-1 p= 0,0167	r=-0,9747 p= 0,0333	r=-0,8721 p= 0,1000	r=0,00588 p=0,9798
EGFR	r= 0,3014 p= 0,5455	r= -0,2228 p= 0,2845	r= 0 p > 0,9999	r= 0,5243 p= 0,0147
Mitose	r= 0,05488 p= 0,9714	r= -0,4177 p= 0,0337	r= -0,3865 p= 0,4000	r= 0,3466 p= 0,1140
Necrose	0,2522 0,4591	r= -0,0106 p= 0,9589	r= -0,3807 p= 0,2084	r= 0,4997 p= 0,0179

Correlação de Spearman. O valor de p foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

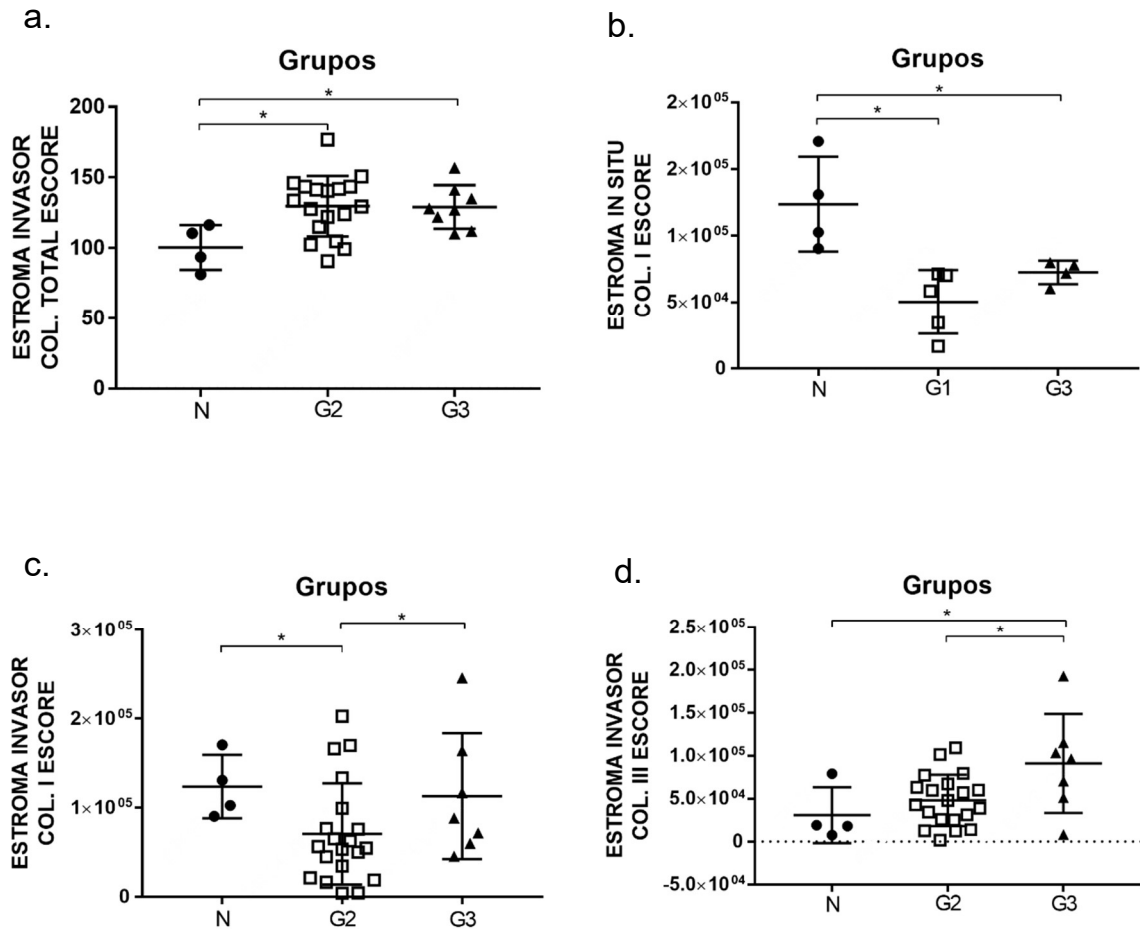


Figura 16. Colágeno total evidenciado pela coloração Tricrômico de Masson e colágeno tipo I e III por Picosirius Red em estroma da mama normal e adjacente às áreas *in situ* e invasoras dos grupos histológicos. **(a)** Colágeno total na mama normal (N) e no estroma adjacente às áreas *in situ* do G1 (CDIS) e G3 (CI-SOE associado às áreas *in situ*). Teste *Ordinary one-way* ANOVA. **(b)** Colágeno tipo I no estroma da mama normal e nas áreas *in situ* do G1 e G3. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. **(c)** Colágeno tipo I no estroma da mama normal e nas áreas invasoras do G2 e G3. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. **(d)** Colágeno tipo III no estroma da mama normal e nas áreas invasoras do G2 e G3. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.6 SUBTIPOS MOLECULARES DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA

As médias da expressão de VCAN no estroma contendo células carcinomatosas invasoras revelou uma fraca imunomarcacão nos subtipos Luminal A, Luminal B HER-2+ e superexpressão de HER-2. Os subtipos Luminal B e Triplo-negativo apresentaram uma imunomarcacão de VCAN moderada. Além disso foi observada maior expressão de VCAN no subtipo triplo-negativo, mostrando diferença estatisticamente significativa apenas quando comparada a expressão na mama normal ($p=0,0195$) (Figura 17a).

O subtipo luminal A obteve maior média de marcação de VKIN em estroma quando comparado aos demais subtipos, porém não foram encontradas diferença estatística entre eles (Figura 17b). Quanto a presença de VKIN no citoplasma das células, não foram encontradas diferenças entre os subtipos (Figura 17c). A tabela 10 mostra esses dados detalhadamente e a Figura 18 mostra o padrão de imunomarcacão dos marcadores utilizados para a classificacão dos subtipos moleculares.

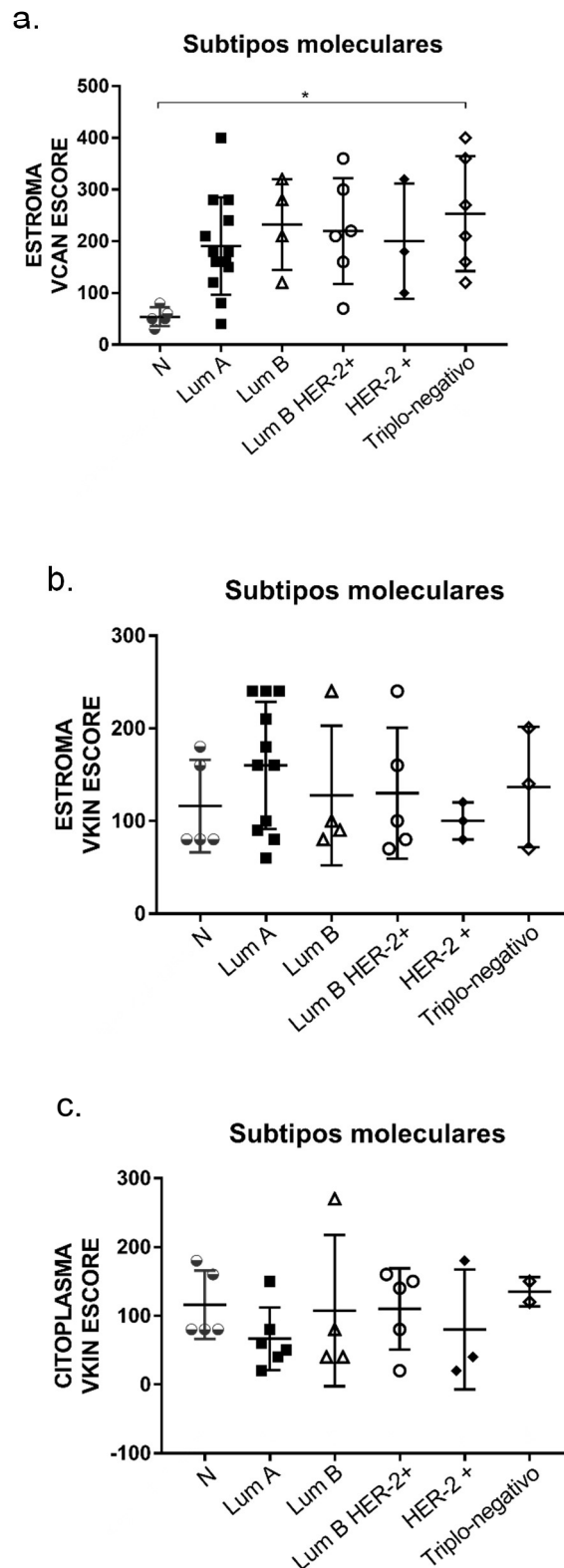


Figura 17. Expressão de versican (VCAN) e presença de versikina (VKIN) nos subtipos moleculares de carcinomas mamários. (a) Expressão de VCAN no estroma da mama normal e nos subtipos moleculares dos carcinomas de mamários. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. (b) Presença de VKIN no estroma da mama normal e nos subtipos moleculares dos carcinomas de mamários. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. (c) Presença de VKIN no citoplasma de células epiteliais de mama normal e em células carcinomatosas dos subtipos moleculares. Teste *Ordinary one-way* ANOVA. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $*p < 0,05$.

Tabela 11. Expressão de versican (VCAN) e versikina (VKIN) em relação aos diferentes marcadores preditivos e subtipos moleculares do câncer de mama.

	VCAN estroma (n=32)	VKIN estroma (n=26)	VKIN Citoplasma (n=22)
	Média±DP n/total	Média±DP n/total	Média±DP n/total
Receptor de estrogênio			
Positivo	195±102 (20/32)	151±69 (15/26)	68±44 (12/22)
Negativo	206±99 (12/32)	123±53 (11/26)	132±72 (10/22)
Receptor de progesterona			
Positivo	199±96 (20/31)	152±69 (17/26)	92±69 (13/22)
Negativo	234±98 (11/31)	125±58 (9/26)	100±61 (9/22)
Ki-67			
<20%	195±102 (20/31)	147±67 (17/26)	102±54 (14/22)
≥20%	242±80 (11/31)	125±59 (9/26)	60±88 (6/22)
HER-2			
Positivo	192±94 (9/32)	101±33 (6/26)	87±70 (6/22)
Negativo	224±100 (23/32)	155±66 (19/26)	101±67 (16/22)
EGFR			
Positivo	203±107 (6/32)	120±81 (4/26)	145±17 (4/22)
Negativo	214±96 (26/32)	145±62 (21/26)	86±68 (18/22)
CK-5/6			
Positivo	-	-	-
Negativo	214±96 (32/32)	139±64 (26/26)	96±65 (22/22)
Subtipos moleculares			
Luminal A	190±94 (13/32)	160±68 (11/26)	81±50 (8/22)
Luminal B	232±87 (4/32)	127±75 (4/26)	107±110 (4/22)
Luminal B HER+	220±102 (6/32)	110±59 (5/26)	130±70 (5/22)
HER-2 +	200±111 (3/32)	100±20 (3/26)	80±78 (3/22)
Triplo-negativos	253±110 (6/32)	136±65 (3/26)	135±21 (2/22)

DP = desvio padrão.

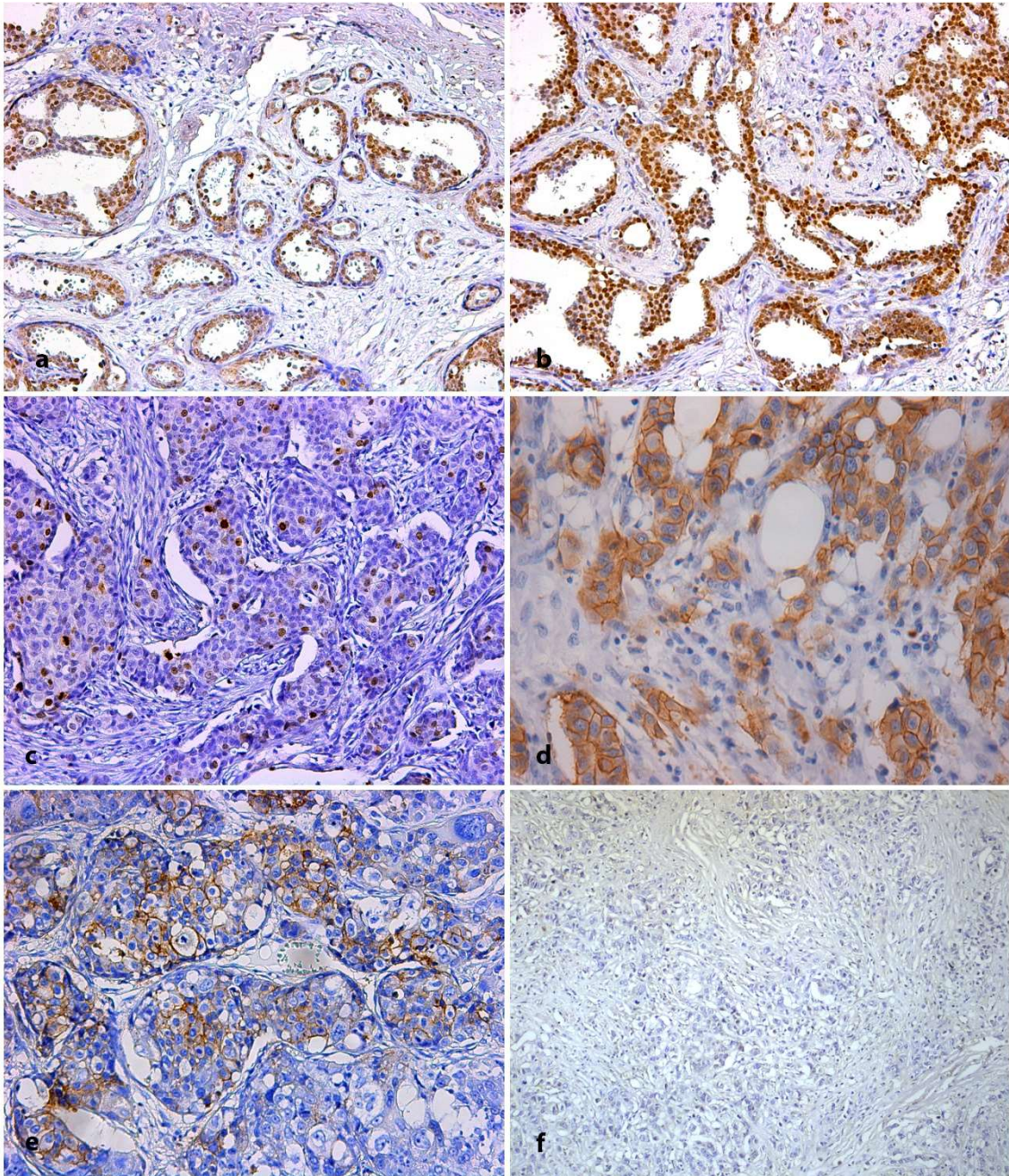


Figura 18. Painel de imunomarcção para classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama. (a) Imunomarcção nuclear de receptor de estrógeno (RE) em células carcinomatosas invasoras. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(b)** Imunomarcção nuclear de receptor de progesterona (RP) em células carcinomatosas invasoras. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(c)** Imunomarcção nuclear de Ki-67 em células carcinomatosas invasoras. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(d)** Expressão de HER-2 membranar completa em células invasoras (escore 3). Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 40x. **(e)** Expressão de EGFR em membrana incompleta em células invasoras (escore 3). Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 40x. **(f)** Imunomarcção negativa de CK-5/6. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x.

6 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma das principais doenças que acomete as mulheres no mundo (BRAY et al., 2018) e apesar dos inúmeros avanços no diagnóstico e tratamento, ainda existem casos especiais, tais como os tumores triplo-negativos, que muitas vezes não são tratados de forma eficiente ou não possuem previsões prognósticas mais precisas diante dos biomarcadores disponíveis hoje (XIPING, et al., 2017). Nesse sentido, a fim de buscar novas formas de tratamento, estudos envolvendo a participação e a importância da MEC no processo de progressão do câncer de mama vêm sendo cada vez mais explorados na literatura (CONKLIN et al. 2011; DRIFKA et al, 2016; NATAL et al., 2019; HOANG et al., 2020). O proteoglicano VCAN, superexpresso na MEC tumoral, desempenha diversos papéis bem descritos, relacionados a imunomodulação e eventos que culminam no desenvolvimento de metástases, como na perda de adesão, motilidade, invasão e angiogênese (RICCIARDELLI et al., 2009; WIGHT et al., 2020). Além disso, VCAN está sujeito a ação de metaloproteinasas, que estão superexpressas no câncer, e sofre clivagem em regiões específicas, dando origem a matriquinas, entre elas a VKIN (HOPE et al., 2016; 2017; ASANO et al., 2017; DHAKAL et al., 2019).

No presente estudo, a análise da expressão do proteoglicano VCAN e seu proteólito VKIN mostraram diferenças de acordo com os grupos histológicos abordados, além de um desbalanço entre VCAN, VKIN e colágeno nos casos analisados. A análise de VCAN e VKIN em todos os casos revelou maior expressão em estroma adjacente às células invasoras em relação mama normal. Esses resultados reforçam o papel de VCAN inibindo a adesão, contribuindo com a motilidade, favorecendo assim a invasão e metástases (WIGHT, 2002; WU, 2004; WU et al., 2005; SUWIWAT et al. 2004; YEE et al., 2007). Achados anteriores pelo nosso grupo de pesquisa, em modelo canino, também mostraram resultados semelhantes em relação a expressão de VCAN nas áreas invasoras (DAMASCENO et al., 2012, 2016). Em mulheres, Skandalis e colaboradores (2011) mostraram que VCAN foi mais expresso nas áreas invasoras quando comparada às áreas *in situ* (SKANDALIS et al., 2011).

Quanto a análise de VKIN, este estudo é o primeiro a mostrar a presença deste proteólito em estroma adjacente às áreas *in situ* e invasora em carcinomas mamários. Outros trabalhos avaliaram sua relação com microambiente pró-inflamatório, atuando

como um DAMP e recrutando células T CD8 + em mieloma e carcinoma colorretal (HOPE et al., 2017;2018; DHAKAL et al., 2018). Além disso, no carcinoma mamário em modelo *in vitro*, Asano e colaboradores (2017) observaram que VKIN estava localizado nas células endoteliais, enquanto VCAN estava localizado ao redor dos vasos de tumores, sugerindo um papel de VKIN na angiogênese.

As neoplasias mamárias podem ser classificadas em subgrupos de acordo com o tipo histológico, o que implica nas características biológicas e clínicas das pacientes (ELLIS et al., 1992). Com propósito de explorar as diferenças na expressão de VCAN e VKIN nesses subtipos, foi avaliada a expressão destas moléculas no estroma adjacente às áreas normais e epiteliais malignas da mama. As análises revelaram que a presença de ambas as moléculas foi maior quando comparado a mama normal. Os CDIS (G1) revelaram forte expressão de VCAN e moderada de VKIN em estroma nas proximidades da membrana basal, além da expressão citoplasmática em células epiteliais basais e mioepiteliais associada a um extenso infiltrado inflamatório periductal. Skandalis e colaboradores (2011) também observaram essa forte expressão de VCAN em estroma próximo da membrana basal nas áreas *in situ*, além de Canavese e colaboradores (2011) que também encontrou forte marcação de VCAN no estroma periductal de CDIS relacionada ao alto grau nuclear comedonecrose, sugerindo que VCAN está expresso nas fases que antecedem a invasão.

Quando foram comparadas áreas *in situ* de CDIS puro (G1) às áreas *in situ* de CI-SOE (G3) ou de carcinomas especiais (G4), VCAN e VKIN notou-se mais presentes no estroma do grupo G1 comparadas ao grupo G3 e G4. Em todos estes grupos, a maioria das áreas *in situ* foram classificadas como de alto grau e exibiram um notável infiltrado inflamatório associado. Esses achados podem estar relacionados aos estágios iniciais da progressão dos CDIS, favorecendo o processo de invasão. Estudos mais robustos que explorem esses mecanismos envolvidos nas etapas iniciais de malignidade são extremamente relevantes para o entendimento de como CDISs podem progredir para carcinomas invasores, uma vez que a progressão não ocorre em todos os casos. Este campo do conhecimento poderá também contribuir para que as terapias sejam cada vez mais individualizadas e minimizar os efeitos colaterais causados pelos tratamentos excessivos (COWELL et al., 2013; CASASENT; EDGERTON; NAVIN, 2017; SHAH et al., 2015; COLEMAN, 2019; VAN SEIJEN et al., 2019).

Os CI-SOEs são tumores bastante heterogêneos do ponto de vista morfológico e molecular (NATAL et al., 2019). No presente trabalho, quando avaliado somente as áreas de invasão, o grupo de CI-SOE (G3) apresentou maior expressão de VKIN em relação ao G2, contudo essa diferença não foi observada em relação a VCAN. Aparentemente, a proteólise de VCAN tem uma relação direta com tumores que apresentam áreas de proliferação epitelial *in situ*, sejam associadas às áreas de invasão ou puras, mas seu papel não está elucidado. A maior expressão de VKIN nestes tumores pode estar associada ao processo de recrutamento de células T CD8+ induzindo um microambiente inflamatório (HOPE et al., 2016; 2017; ASANO et al., 2017; DHAKAL et al., 2019) ou até mesmo estar relacionado aos estágios iniciais da progressão e assim contribuindo para invasão das células neoplásicas no estroma. A análise isolada do grupo G3 também mostrou maior expressão de VCAN em estroma adjacente às áreas de invasão em relação às áreas *in situ*, corroborando com outros achados da literatura e reforçando o papel destas moléculas na progressão tumoral (SUWIWAT et al. 2004; YEE et al., 2007; SKANDALIS et al., 2011).

A investigação sobre a possível relação entre proteólise de VCAN, necrose e redução da proliferação celular pode ser importante para compreensão do remodelamento das MEC no câncer de mama, pois esses eventos podem estar relacionados a contenção do tumor. Nossos dados mostraram uma correlação positiva entre VKIN em citoplasma de células carcinomatosas invasoras e necrose, bem como uma correlação negativa entre VKIN em estroma e mitose, sugerindo uma relação contrária ao crescimento tumoral. Contudo, VKIN parece ter um papel contraditório a depender do contexto que está inserida. Silver e colaboradores (2008) mostraram que a reduzida proteólise de VCAN, causada pela enzima ADAMTS-20 mutada na pele de embriões de camundongos, aumentou as taxas de apoptose nessas áreas, enquanto McCulloch e colaboradores (2009) mostraram que VKIN é necessária para a regressão interdigital, em embriões de camundongos, também mediada por apoptose.

Também observamos que a presença de VKIN no citoplasma das células carcinomatosas invasoras apresentou correlação positiva com a expressão de EGFR, importante receptor ligado a proliferação celular. Previamente, foi observado que durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, a proteólise de VCAN é importante para a proliferação mesenquimal durante o fechamento do palato. Porém não essencial, pois quando o proteólito foi introduzido, a proliferação celular nessa região não foi afetada. Além disso, o domínio G3 de VCAN que contém o motivo de

ligação para EGFR, é que pode estar relacionado com o processo de proliferação nessas áreas (ENOMOTO et al., 2010).

No presente trabalho, VCAN e seu proteólito não apresentaram relação com os dados clínico-patológicos obtidos neste trabalho, como grau histológico, IPN, estadiamentos anatomopatológico e prognóstico, tamanho do tumor e metástase para linfonodo, e isso pode estar relacionado ao tamanho da amostra utilizada. Suwiat e colaboradores (2004) relacionaram a superexpressão de VCAN ao alto grau histológico e um fator preditivo de recidiva. Enquanto, Canavese e colaboradores (2011) observaram relação entre a superexpressão de VCAN e o alto grau nuclear nos CDIS. Dados sobre a relação entre VKIN e dados clínico-patológicos de pacientes com câncer de mama ainda não foram documentados na literatura.

Outro elemento importante para avaliação do remodelamento da MEC, é o colágeno, o qual além de ser abundante na matriz tumoral também é considerado promotor ou inibidor da progressão dos carcinomas mamários, sendo considerado até como biomarcador prognóstico (CONKLIN et al. 2011). Além disso, a alta densidade da mama foi relacionada ao aumento da deposição e organização de colágeno, bem como diminuição de macrófagos ativados no estroma peritumoral, sendo considerada um fator de risco para o câncer de mama (HUO et al., 2015).

Observamos que ao comparar com áreas normais, as áreas de invasão exibem um aumento de colágeno total, indicando regiões de desmoplasia peritumoral. A relação entre a deposição de colágeno e expressão de VCAN e VKIN no microambiente tumoral também foi investigada neste trabalho. Foi observada uma relação inversa entre a densidade de colágeno, analisada pela coloração de Tricrômico de Masson, e expressão de VCAN no estroma adjacente tanto nas áreas *in situ* quanto de invasão. Apesar da relação entre VCAN e colágeno ser pouco explorada, um trabalho recente mostrou que os proteoglicanos podem regular a fibrilogênese e a reorganização do colágeno tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Foi demonstrado que VCAN regula a fibrilogênese e a compactação, condensação e contração do colágeno mediada por células (CHEN et al., 2020), o que pode explicar relação inversa encontrada neste trabalho entre VCAN e colágeno, uma vez que foram analisadas aqui apenas a intensidade densitométrica do colágeno por software. Contrariando os achados do presente trabalho, Bukong e colaboradores (2016) observaram que o aumento de VCAN estava relacionado a fibrose hepática, e sua diminuição foi associada ao remodelamento da MEC pela ação de enzimas

proteolíticas chamadas ADAMTS, o que levaria a diminuição do colágeno e redução da fibrose. Já Wight (2017) considera que a MEC sofre alterações durante o desenvolvimento tumoral, com aumento dos níveis de VCAN e AH iniciais e posterior aumento de colágeno. Ao defender a ideia de que o tumor é uma ferida que não cicatriza, Dvorak (1986) apontou que a matriz não se transforma para uma MEC madura, fibrosa e reticulada. Podendo, dessa forma, favorecer constante produção de VCAN durante a progressão tumoral.

O colágeno tipo I e tipo III nas áreas *in situ* e invasoras dos carcinomas mamários foram evidenciados pela coloração especial Picrosirius Red em luz polarizada, a qual pode fornecer informações sobre o colágeno tipo I e III de forma barata e prática para rotina em laboratórios de patologia (DRIFKA et al., 2016). Os dados sobre colágeno tipo I aqui apresentados não revelaram diferenças entre a mama normal, áreas *in situ* e invadidas dos tumores. Contudo, Kakkad e colaboradores (2012) sugerem que a alta densidade do colágeno tipo I está associada à metástase no câncer de mama primário, apontando essa molécula como possível biomarcador. Além disso, nossos dados revelaram uma correlação inversa entre a presença de colágeno tipo I e VCAN nas áreas *in situ*, bem como com VKIN tanto nas áreas *in situ* quanto nas áreas de invasão, o que pode estar relacionado a regulação da fibrilogênese por VCAN na sua forma íntegra (CHEN et al. 2020) nos estágios mais avançados da progressão. Além disso, sabe-se que VCAN se liga a fibronectina e colágeno tipo I limitando a ligação das células a essas estruturas, diminuindo a adesão celular, como demonstrado em melanoma (TOUAB et al., 2002; HERNÁNDEZ et al., 2011b).

Outro resultado que chamou atenção foi maior densidade de colágeno tipo III nas áreas *in situ* em relação às áreas de invasão. Segundo Volk e colaboradores (2011), o colágeno tipo III está relacionado a regeneração e cicatrização de feridas após lesão cutânea. Voltando a ideia de que o tumor é uma ferida que não cicatriza (DVORAK, 1986), Brisson e colaboradores (2015) mostraram *in vitro* e *in vivo* evidências de que o colágeno tipo III está relacionado a supressão do crescimento do tumor e metástase do câncer de mama em modelo murino de câncer de mama triplo-negativo metastático (4T1), porém o aumento do colágeno tipo III pode estar relacionado ao aumento dos fibroblastos em resposta aos estímulos durante a progressão do câncer.

Na avaliação dos grupos histológicos, as áreas de invasão do grupo G3 apresentaram maior densidade de colágeno tipo III em relação a mama normal e a G2, o que pode ser explicado pela presença de áreas *in situ* no grupo G3 (CI-SOE associado a áreas *in situ*). Apesar de não revelar diferenças estatisticamente significativas, os CDIS também apresentaram maior presença de colágeno tipo III em relação a mama normal e as áreas *in situ* de G3. Provavelmente, o aumento de colágeno tipo III em lesões *in situ* puras ou associadas sugere uma reação antitumoral nas fases iniciais.

Na análise da expressão de VCAN e VKIN nos diferentes subtipos moleculares dos carcinomas em estudo, a expressão de VCAN foi maior no subtipo triplo negativo em relação aos demais, mas só houve diferença estatisticamente significativa quando comparada a expressão na mama normal, o que reforça mais uma vez a maior presença de VCAN nos tumores de pior prognóstico. Já VKIN foi maior no subtipo luminal A, porém também não observamos diferenças expressivas entre os subtipos quanto a presença de VKIN. Investigações mais robustas poderão ser importantes para elucidar o verdadeiro papel de VKIN no câncer de mama, pois poderão trazer novas perspectivas prognósticas, especialmente devido ao seu possível papel imunomodulador.

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados aqui demonstram que:

- A maior expressão de VCAN no estroma adjacente às células neoplásicas invasoras comparado ao estroma mamário normal reforça o papel deste proteoglicano na invasividade de células neoplásicas na matriz extracelular peritumoral.

- VCAN e seu proteólito não mostraram relação com os dados clínico-patológicos aqui apresentados, o que pode estar relacionado ao limitado número de casos e a heterogeneidade dos tumores estudados;

- A presença de VKIN nos grupos histológicos sugerem que esses fragmentos podem estar relacionados aos processos iniciais de progressão dos tumores, uma vez que parece estar mais presente nas lesões CDIS quando comparadas aos carcinomas invasores, contudo estudos futuros serão necessários para esclarecer o papel desses elementos para melhor entendimento da progressão tumoral;

- A maior detecção de colágeno tipo III nas áreas *in situ* sugere uma reação antitumoral, uma vez que essa molécula apresenta função supressora do crescimento tumoral e de metástase dos carcinomas mamários;

- A correlação linear inversa entre colágeno tipo I e VKIN sugere possível proteólise e remodelamento da MEC peritumoral;

- A aparente maior expressão de VCAN nos carcinomas triplo-negativos em relação aos demais, pode ser indicativo de que existem diferenças entre a presença dessa molécula nos subtipos moleculares do câncer de mama, entretanto maiores estudos são necessários para elucidar o papel de VCAN e VKIN nestes tumores.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi delineado no intuito de investigar as modificações apresentadas na MEC nos diferentes estágios de progressão dos carcinomas mamários e então contribuir para a descobertas de novos biomarcadores e alvos terapêuticos para o câncer de mama. Os dados aqui apresentados sugerem que VCAN e seu proteólito podem trazer novas perspectivas quanto ao entendimento da progressão dos CDIS. Para explorar melhor este potencial, estudos futuros serão necessários no intuito de demonstrar a função dessas moléculas no processo de progressão desses tumores.

Apesar de existir um aumento da expressão de VCAN nos tumores de mama, acreditamos que nos tumores triplo-negativos, tumores imunogênicos e de pior prognóstico, podem apresentar uma expressão diferencial desse proteoglicano e de VKIN em relação aos subtipos luminais e HER-2 superexpressos. Portanto, dados mais robustos, com maior número de casos de câncer de mama se fazem necessários.

Quanto a caracterização morfológica da MEC, técnicas como Geração de segundo harmônico, padrão ouro para a análise morfométrica do colágeno, poderá auxiliar trazendo conclusões mais elucidativas sobre a relação entre o colágeno e a proteólise de VCAN. Devido às limitações em relação a coleta dos dados clínico-patológicos, como a sobrevida das pacientes e rastreamento de metástase a distância, não foi possível compreender melhor o papel biológico das moléculas, além do significado clínico dos nossos resultados.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, A.E. *et al.* Prognostic impact of EGFR and cytokeratin 5/6 immunohistochemical expression in triple-negative breast cancer. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 28 p. 43-53, 2017.
- ALLISON, K. H. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 2020.
- ALLRED, D. C. Ductal carcinoma in situ: Terminology, classification, and natural history. **Journal of the National Cancer Institute - Monographs**, n. 41, p. 134–138, 2010.
- AMIN M.B. *et al.* **AJCC Cancer Staging Manual**. 8th ed. New York: Springer; 2017.
- ANGAHAR, L. T. An Overview of Breast Cancer Epidemiology, Risk Factors, Pathophysiology, and Cancer Risks Reduction. **MOJ Biology and Medicine**, v. 1, n. 4, p. 92–96, 2017.
- ARENDT, L. M. *et al.* Stroma in breast development and disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 11–18, 2011.
- ASANO, K. *et al.* Stromal Versican Regulates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- BARBARESHI, M.B. *et al.* P63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. **American Journal Surgery Pathology**, v. 25, n.8, p. 1054-60, 2001.
- BERGAMASCHI, A *et al.* Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 3, p. 357-67, 2008.
- BHARGAVA, R. *et al.* CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the "basal-like" phenotype of breast carcinoma. **American journal of clinical pathology**, v. 130, n.5 p. 724-30, 2008.
- BINDER, M. J. *et al.* The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyalectan proteoglycans and ADAMTS enzymes. **Cancer Letters**, v. 385, p. 55–64, 2017.
- BLOWS, F. M. *et al.* Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: A collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 5, 2010.
- BONNANS, CAROLINE, CHOU, J., WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2015.

BORG, A. *et al.* HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. **Cancer Research**, v. 50, n. 14, p. 4332–7, 1990.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

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. 1471-86, 2015.

BUERGER, H. *et al.* Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast - Evidence of multiple genetic pathways. **Journal of Pathology**, v. 187, n. 4, p. 396–402, 1999.

BUKONG, T. *et al.* Versican: a novel modulator of hepatic fibrosis. **Laboratory of Investigation**, v. 96, p. 361–374, 2016.

BULBUL, A. *et al.* Clinical value of Ki67 in risk-stratifying HR-positive breast cancer. **Journal of Clinical Oncology** V.37, n. 5, 2019.

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, p.97–103, 2011.

CASASENT, A.K.; EDGERTON, M.; NAVIN, N.E. Genome evolution in ductal carcinoma in situ: invasion of the clones. **The Journal of Pathology**, v. 241, n. 2, p. 208–218, 2017.

CSERNI, G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. **Pathologica**, v. 112, n. 1, p. 25-41, 2020.

CHEN, D. *et al.* Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 19065, 2020.

CHEANG, M. C. U. *et al.* Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368–1376, 2008.

CHEANG, M. C. U. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009.

COATES, A. S. *et al.* Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology**, v.26, n.8, p. 1533–1546, 2015.

COLEMAN, W.B. Breast Ductal Carcinoma in Situ: Precursor to Invasive Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 5, p. 942-945, 2019.

CONKLIN, M. W. *et al.* Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 3 p. 1221-32, 2011.

COWELL, C.F. *et al.* Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 5, p. 859–869, 2013.

CURTIS, C. *et al.* The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346-52, 2012.

DAI, X. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American Journal Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.

DAMASCENO, K. A. *et al.* Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: Is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.

DAMASCENO, K. A. *et al.* HER-2 and EGFR mRNA expression and its relationship with versican in malignant matrix-producing tumors of the canine mammary gland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–14, 2016.

DHAKAL, B. *et al.* Versican proteolysis predicts immune effector infiltration and post-transplant survival in myeloma. **Leukimia & Lymphoma**, v.60, n. 10, p. 2558-2562, 2019.

DAWSON, S. J. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 5, p. 617–628, 2013.

DIECI, M. V. *et al.* Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. **Seminars in cancer biology** v. 52, n. 2, p. 16-25, 2018.

DOURS-ZIMMERMANN, M. T.; ZIMMERMANN, D. R. A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 52, p. 32992–32998, 1994.

DOWSETT, M. *et al.* Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the international Ki67 in breast cancer working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656–1664, 2011.

DRIFKA, C. R. *et al.* Comparison of Picrosirius Red staining with Second Harmonic Generation imaging for the quantification of clinically relevant collagen fiber features in histopathology samples. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 64, n. 9, p. 519–529, 2016.

DU, W. W. *et al.* The Role of Versican in Modulating Breast Cancer Cell Self-renewal. **Molecular Cancer Research**, v. 11, n. 5, p. 443–455, 2013.

DU, W. W.; YANG, W.; YEE, A. J. Roles of versican in cancer biology--tumorigenesis, progression and metastasis. **Histology and histopathology**, v. 28, n. 6, p. 701–13, 2013.

DUFFY, M. J. *et al.* Metalloproteinases: Role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 4, p. 252–257, 2000.

DVORAK, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 315, p.1650–9,1986;

ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 20, p. 479–489, 1992.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Assessment of histological grade. In: Elston CW, Ellis IO, editors. **The Breast**. 13. Churchill Livingstone, Edinburgh: New York; 1998. p. 356-84.

ENOMOTO, H. *et al.* Cooperation of two ADAMTS metalloproteases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. **Development**, v,137, n. 23, p. 4029-38, 2010.

ERLER, J. T. *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1222–1226, 2006.

ERLER Q. T. *et al.* Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 26, p. 4281–4286, 2009.

FRAGOMENI, S. M.; SCIALIS, A.; JERUSS, J. S. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018.

FULFORD, L. G. *et al.* Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **Histopathology**, v. 49, n. 1, p. 22–34, 2006.

GAO, D. *et al.* Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. **Cancer Res**, v. 72, n. 19, p. 4883–4889, 2012.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013.

GUEYE, N. A. *et al.* Versican proteolysis by ADAMTS proteases and its influence on sex steroid receptor expression in uterine leiomyoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 5, p. 1631–1641, 2017.

HALPER, J.; KJAER, M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. **Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases**, p. 31–47, 2014.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* V3 versican isoform alters the behavior of human melanoma cells by interfering with CD44/ErbB-dependent signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 2, p. 1475–1485, 2011a.

HERNÁNDEZ, D. *et al.* Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 27, p. 269–275, 2011b.

HERSCHKOWITZ, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. 1–17, 2007.

HOANG, V. T. *et al.* ERK5 Is Required for Tumor Growth and Maintenance Through Regulation of the Extracellular Matrix in Triple Negative Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**. v. 10, n. 1164, 2020.

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

HOPE, C. *et al.* Versican-derived matrikines regulate Batf3-dendritic cell differentiation and promote T-cell infiltration in colorectal cancer. **Journal of Immunology**, v. 199, n. 5, p. 1933–1941, 2017.

HOON TAN, P. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the breast. **Histopathology**, v.77, p. 181–5, 2020.

HUO, C.W. *et al.* High mammographic density is associated with an increase in stromal collagen and immune cells within the mammary epithelium. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 79, 2015.

HU, G.; LI, L.; XU, W. Extracellular matrix in mammary gland development and breast cancer progression. **Frontiers in Laboratory Medicine**, v. 1, n. 1, p. 36–39, 2017.

HUDIS, C.; GIANNIB, L. Triple negative breast cancer: a unmet medical needs. **The oncologist**, v. 16, p. 1-11, 2011.

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: **INCA**, 2019.

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

JENA, M. K.; JANJANAM, J. Role of extracellular matrix in breast cancer development: a brief update. **F1000Research**, v. 7, p. 274, 2018.

JIANG, Y. *et al.* Advances in Brief Stimulation of Mammary Tumorigenesis by Systemic Tissue Inhibitor of Matrix. **Cancer Research**, v. 61, n. 6, p. 2365–2370, 2001.

KAI, F. B.; DRAIN, A. P.; WEAVER, V. M. The Extracellular Matrix Modulates the Metastatic Journey. **Developmental Cell**, v. 49, n. 3, p. 332–346, 2019.

KAKKAD, S. M. *et al.* Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 11, 116017, 2012.

KELWICK, R. *et al.* The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, 2015.

KENAGY, R. D.; PLAAS, A. H.; WIGHT, T. N. Versican Degradation and Vascular Disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**. v. 16, n. 6, p. 209–215, 2006.

KENNECKE, H. *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3271-7, 2010.

KERLIKOWSKE, K. Epidemiology of ductal carcinoma in situ. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 41, p. 1–11, 2010.

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, 2010.

KRISHNAMURTI, U., SILVERMAN, J.F. HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 21, n. 2, p. 100-7, 2014.

LAKHANI, S. R. *et al.* **WHO classification of tumours of the breast**. 4 ed Lyon: IARC, 2012.

LE, Q.T. *et al.* Validation of lysyl oxidase as a prognostic marker for metastasis and survival in head and neck squamous cell carcinoma: Radiation Therapy Oncology Group trial 90-03. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 26, p. 4281-6, 2009.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. Liotta, L. A, and Kohn, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Tissue Engineering**, n. 2001, p. 399429–399429, 2001.

LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STETLER-STEVENSON, W. G. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 327–336, 1991.

LIU, J. *et al.* Collagen 1A1 (COL1A1) promotes metastasis of breast cancer and is a potential therapeutic target. **Discovery Medicine**, v. 25, n. 139, p. 211-223, 2018.

LOPEZ, J.I. *et al.* In situ force mapping of mammary gland transformation. **Integrative Biology : quantitative biosciences from nano to macro**, v. 3, n. 9, p. 910–921, 2011.

LORD, S. J. *et al.* Breast cancer risk and hormone receptor status in older women by parity, age of first birth, and breastfeeding - a case-control study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 7, p. 1723–1730, 2009.

LYONS, T. R. *et al.* Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. **Nature Medicine**, v. 17, n. 9, p. 1109–1116, 2011.

MARDEKIAN, S. K.; BOMBONATI, A.; PALAZZO, J. P. Ductal carcinoma in situ of the breast: The importance of morphologic and molecular interactions. **Human Pathology**, v. 49, p. 114–123, 2016.

MCCULLOCH, D. R. *et al.* ADAMTS Metalloproteases Generate Active Versican Fragments that Regulate Interdigital Web Regression. **Developmental Cell**, v. 17, n. 5, p. 687–698, 2009.

MCDANIEL, S. M. *et al.* Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 2, p. 608–620, 2006.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ**, v. 321, 2000.

MILIOLI, H. H. *et al.* Basal-like breast cancer: molecular profiles, clinical features and survival outcomes. **BMC Medical Genomics**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017.

MIQUEL-SERRA, L. *et al.* V3 versican isoform expression has a dual role in human melanoma tumor growth and metastasis. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 9, p. 889–901, 2006.

MUENST, S. *et al.* Abstract 350: Pregnancy at early age is associated with a reduction of progesterone-responsive cells and epithelial Wnt signaling in human breast tissue. **Cancer Research**, v. 77, n. 13 Supplement, p. 350–350, 2017.

MUKHERJEE, A., *et al.* Associations between genomic stratification of breast cancer and centrally reviewed tumour pathology in the METABRIC cohort. **npj Breast Cancer** v.4, n.5, 2018.

NAHED, A. S.; SHAIMAA, M. Y. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. **Cancer Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 496, 2016.

NANDADASA, S.; FOULCER, S.; APTE, S. S. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. **Matrix Biology**, v. 35, p. 34–41, 2014.

NATAL, R. A. *et al.* Exploring Collagen Parameters in Pure Special Types of Invasive Breast Cancer. **Scientific reports** v. 9, n. 1, p. 7715, 2019.

NARA, Y *et al.* Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. **The Histochemical Journal**, v. 29, n. 1, p. 21-30, 1997.

NIELSEN, T. O. *et al.* Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 919, p. 5367–5374, 2004.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Cancer Metastasis Rev.** v.8, n.2, p.98-101, 1998.

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**, 22155420937098, 2020.

PAPPAS, A. G. *et al.* Versican modulates tumor-associated macrophage properties to stimulate mesothelioma growth. **Oncoimmunology**, v.8,2 e1537427, 2018.

PEROU, C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, 2000.

PRAT, A. *et al.* Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. **The Oncologist**, v. 18, n. 2, p. 123–133, 2013.

PRAT, A. *et al.* Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. **Breast**, v. 24, p. S26–S35, 2015.

RADISKY, E. S.; RAEESZADEH-SARMAZDEH, M.; RADISKY, D. C. Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 11, p. 3531–3548, 2017.

RAHMANI, M. *et al.* Versican: signaling to transcriptional control pathways This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigator's Forum. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 77–92, 2006.

RAKHA, E. A. *et al.* Expression profiling technology: Its contribution to our understanding of breast cancer. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 67–81, 2008.

REIS-FILHO, J. S. LAKHANI, S. R. Breast cancer special types: why bother? **Journal of Pathology, The**, v. 2016, p. 394–398, 2006.

RICCIARDELLI, C. *et al.* The biological role and regulation of versican levels in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 233–245, 2009.

SGROI, D. C. Preinvasive Breast Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, n. 1, p. 193–221, 2009.

SHAH, C. *et al.* Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Evaluating the Role of Radiation Therapy in the Management and Attempts to Identify Low-risk Patients. **American journal of clinical oncology**, v. 38, n. 5, p. 526-33, 2015.

SANDY, JD, *et al.* Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. **Biological Chemistry**, v.276, n. 16, p: 13372-8, 2001.

SILVER, D. L. *et al.* The secreted metalloprotease ADAMTS20 is required for melanoblast survival. **PLoS genetics**, v, 4, n. 2, 2008.

SKANDALIS, S. S. *et al.* Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. **BMC Cancer**, v. 11, p. 314, 2011.

SØRLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–74, 2001.

SØRLIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

SOTIRIOU, C. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 18, p. 10393–10398, 2003.

SUN, C. *et al.* Quantitative measurement of breast carcinoma fibrosis for the prediction in the risk of bone metastasis. **Am J Transl Res**, v.10, n. 6, p. 1852-1859, 2018.

SUWIWAT, S. *et al.* Expression of Extracellular Matrix Components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin, and Hyaluronan, and Their Association with Disease Outcome in Node-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 7, p. 2491–2498, 2004.

TAMIMI, R. M. *et al.* Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 4, p. 1–9, 2008.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1855, n. 2, p. 276–300, 2015.

THEOCHARIS, A. D. *et al.* Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

TIMMS, K.; MAURICE, S. B. Context-dependent bioactivity of versican fragments. **Glycobiology**, v. 30, n. 6, p. 365–373, 2019.

TOUAB, M. *et al.* Versican Is Differentially Expressed in Human Melanoma and May Play a Role in Tumor Development. **The American Journal of Pathology**, v. 160, n. 2, p. 549-57, 2002.

VAN SEIJEN, M. *et al.* Ductal carcinoma in situ: to treat or not to treat, that is the question. **British Journal of Cancer**, v. 121, n. 4 p. 285-292, 2019.

VODUC, K. D. *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684-91, 2010.

VOLK, S.W. *et al.* Diminished type III collagen promotes myofibroblast differentiation and increases scar deposition in cutaneous wound healing. **Cells, Tissues, Organs**, v. 194, n. 1, p. 25-37, 2011.

WALKER, C., MOJARES, E., Del RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 2018.

WANG, M. *et al.* Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. **Oncogene**, v. 14, n. 23, p. 2767–2774, 1997.

WANG, M. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Autophagy Enhances Progression of Triple-Negative Breast Cancer Cells. **Medical Science Monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 23, p. 3904–3912, 2017.

WEEN, M. P.; OEHLER, M. K.; RICCIARDELLI, C. Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 2, p. 1009–1029, 2011.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, n. 4, p. R245–R262, 2010.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010.

WELLINGS; JENSEN. On the Origin and Progression of Ductal Carcinoma in the Human Breast. **Oxford Journals**, v. 50, n. 5, p. 1111–1118, 1973.

WHO. **Global Health Observatory**. Geneva: World Health Organization; 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>. Último acesso em: 03 de Novembro de 2020.

WHO **Classification of Tumours of the Breast**. WHO classification of tumours series. 5th ed. Vol. 2. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019.

WIGHT, T. N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 617–23, 2002.

WIGHT, T. N. Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 60-61, p. 38-56, 2017.

WIGHT, T. N *et al.* Versican-A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v.11, n. 512, 2020.

WOLFF, A.C. *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. **Journal of Clinical Oncology**. v. 36, n. 20, p. 2105-2122, 2018.

WU, Y. Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and $\alpha 1$ -integrin. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 11, p. 2227–2237, 2004.

WU, Y. J. V *et al.*. The interaction of versican with its binding partners. **Cell Research**, v. 15, n. 7, p. 483–494, 2005.

XIPING, Z. *et al.* Roles of MALAT1 in development and migration of triple negative and Her-2 positive breast cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2255-2267, 2017.

YEDJOU, C.G. *et al.* Health and Racial Disparity in Breast Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1152, p. 31-49, 2019.

YEE, A. J. *et al.* The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2007.

YONEDA, T. *et al.* Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 10, p. 2509–2517, 1997.

ZAKO, M. *et al.* Expression of PG-M(V3), an Alternatively Spliced Form of PG-M without a Chondroitin Sulfate Attachment Region in Mouse and Human Tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3914–3918, 1995.

ZHANG, K. The Collagen Receptor Discoidin Domain Receptor 2 Stabilizes Snail1 Protein to Facilitate Breast Cancer Metastasis. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 677–687, 2013.

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

ZHOU, W. *et al.* Molecular subtypes in ductal carcinoma in situ of the breast and their relation to prognosis: a population-based cohort study. **BMC cancer** v. 13, n. 512, 2013.

APÊNDICE A – Intensidade de versican e versikina na avaliação imuno-histoquímica.

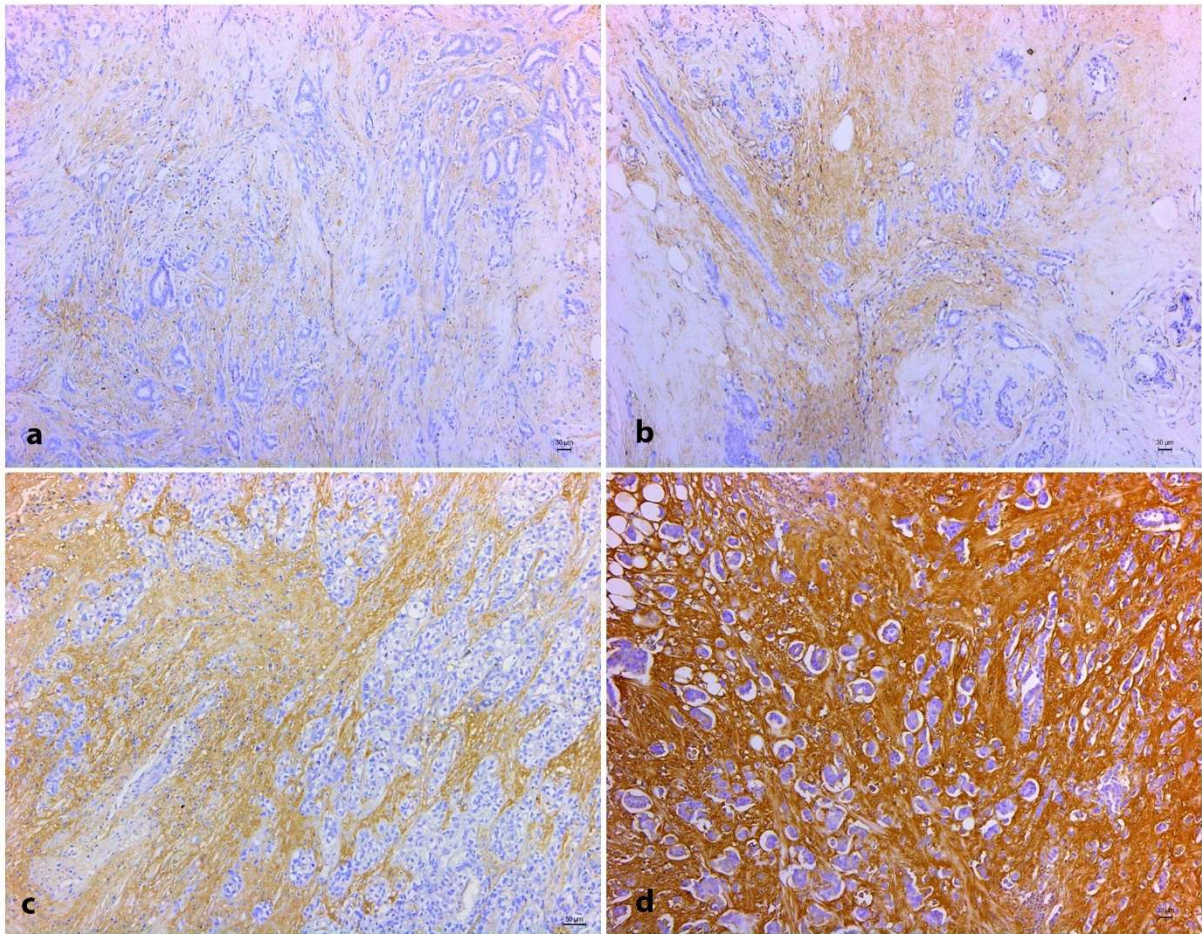


Figura 19. Graus de intensidade utilizados na análise imuno-histoquímica de versican. (a) Intensidade (1) quando negativo ou fracamente marcado. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(b)** Intensidade (2) quando positivo fraco. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(c)** Intensidade (3) quando positivo moderado. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(d)** Intensidade (4) positivo forte. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x.

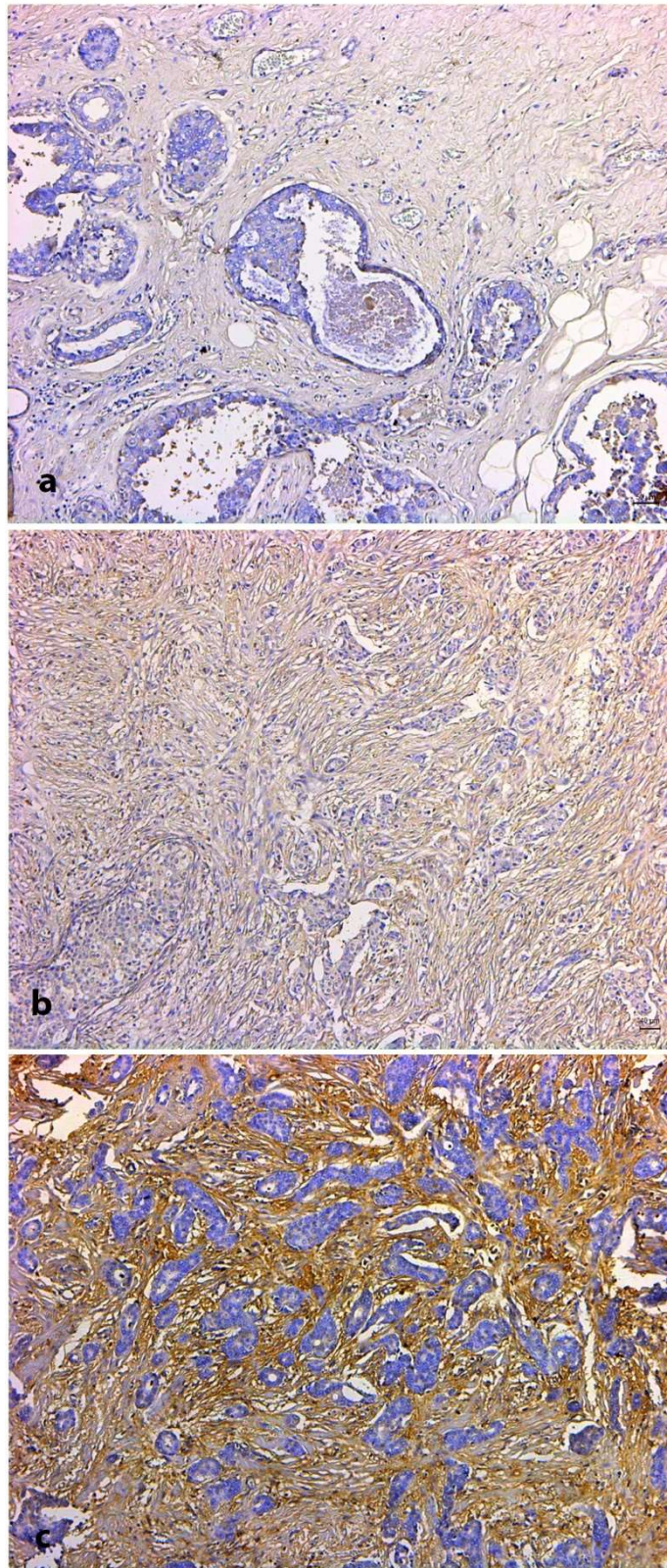


Figura 20. Graus de intensidade utilizados na análise imuno-histoquímica de versikina. (a) Intensidade (1) quando negativo ou fracamente marcado. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(b)** Intensidade (2) quando positivo fraco. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x. **(c)** Intensidade (3) quando positivo moderado. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 10x.

APÊNDICE B – Resultados da análise de correlação da presença de versican (VCAN) e versikina (VKIN) no estroma adjacente às áreas *in situ* (IS) e invasoras (IN) e citoplasma das células carcinomatosas com os dados clínico-patológicos.

	Estroma				Citoplasma	
	VCAN IS	VCAN IN	VKIN IS	VKIN IN	VKIN IS	VKIN IN
Idade						
r	0,4984	0,1562	0,6602	0,09455	0,1466	0,07463
p	0,0716	0,3931	0,0223	0,6459	0,6286	0,2187
Cor						
r	0,2803	-0,1232	0,02102	0,195	0,393	0,00199
p	0,3357	0,5016	0,9515	0,3397	0,1821	0,8437
Tamanho do tumor						
r	-0,3922	-0,1005	-0,06337	-0,1114	-0,255	0,2186
p	0,328	0,6041	0,9286	0,6041	0,5714	0,0377
Metástase para linfonodo						
r	-0,1212	0,01323	-0,3017	-0,05221	0,0726	0,07106
p	0,7671	0,9437	0,4679	0,8	0,8714	0,2304
Estadio anatomopatológico						
r	-0,2436	0,07742	0,03457	0,01994	0,01391	0,0003363
p	0,5246	0,6789	0,9226	0,9992	0,9583	0,9354
Estadio prognóstico						
r	-0,4894	0,1249	-0,5445	-0,155	-0,2838	0,1061
p	0,1822	0,5033	0,1714	0,4497	0,4857	0,1392
Grau histológico de Nottingham						
r	-0,178	0,09055	0,1387	-0,3147	-0,2225	0,03702
p	0,5439	0,6221	0,663	0,1173	0,4676	0,391
Índice prognóstico de Nottingham						
r	0,09924	0,1224	0,4657	0,03815	0,5016	0,08976
p	0,7984	0,5044	0,2286	0,8532	0,1929	0,1755
Invasão linfática						
r	-0,6168	-0,03574	-0,3089	-0,06519	-0,3807	0,01111
p	0,026	0,846	0,3576	0,7517	0,2084	0,6406
Necrose						
r	0,4179	0,2178	0,2522	-0,01062	0,2687	0,2722
p	0,1518	0,2312	0,4591	0,9589	0,3958	0,0128
Receptor de estrogênio						
r	0,06893	0,107	-0,1403	0,3003	-0,009749	0,09095
p	0,8127	0,5599	0,6596	0,136	0,9761	0,1726
Receptor de progesterona						
r	-0,1198	0,1009	-0,4803	0,3326	-0,3114	0,00774
p	0,6796	0,5827	0,1149	0,0969	0,2962	0,969
Ki-67						
r	-0,3006	0,3423	-0,3511	0,02489	-0,1168	0,0979
p	0,292	0,0551	0,2598	0,9039	0,7004	0,1563

HER-2						
r	0,2502	0,1504	0,1143	-0,1886	-0,01539	0,02996
p	0,4043	0,4275	0,7571	0,3665	0,9636	0,453
EGFR						
r	0,1745	0,02291	0,3014	-0,2228	0	0,5243
p	0,7143	0,9043	0,5455	0,2845	>0,9999	0,0147

APÊNDICE C – Resultado das correlações entre o infiltrado inflamatório e versican (VCAN) e versikina (VKIN) nas áreas *in situ* dos carcinomas mamários.

	Estroma		Citoplasma					
	VCAN	VKIN	VKIN	RE	RP	Ki-67	HER-2	EGFR
r	0,3542	-0,00612	-0,2339	-0,5479	-0,1697	-0,1131	0,6809	0,1005
p	0,2807	0,9896	0,4836	0,068	0,5941	0,7252	0,0389	0,8182

APÊNDICE D - Resumo gráfico dos resultados

