

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: RELAÇÃO DA  
VERSİKINA COM O PERFIL LINFOCÍTICO E O  
MICROAMBIENTE TUMORAL**

**MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO**

Salvador – BA

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: RELAÇÃO DA VERSIKINA  
COM O PERFIL LINFOCÍTICO E O MICROAMBIENTE  
TUMORAL**

**MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO**

**Médica Veterinária**

Salvador – BA

2024

**MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO**

**TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: RELAÇÃO DA VERSIKINA  
COM O PERFIL LINFOCÍTICO E O MICROAMBIENTE  
TUMORAL**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da  
Bahia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em  
Ciência Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Estrela-Lima

Coorientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

**SALVADOR-BA**

**2024**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação  
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Pinto, Marcela Próspero Rodrigues.

Tumores mamários caninos: relação de versikina com o perfil linfocítico e o microambiente tumoral / Marcela Próspero Rodrigues Pinto. - 2024.

103 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima.

Coorientadora: Profa. Dra. Karine Araújo Damasceno.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2024. -

1. Medicina veterinária de pequenos animais. 2. Oncologia veterinária. 3. Patologia comparada.


Tumores mamários caninos: relação da versikina com o perfil linfocítico e o microambiente tumoral

MARCELA PRÓSPERO RODRIGUES PINTO


Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos

Salvador, 29 de novembro de 2024

Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA**  
Data: 02/12/2024 14:06:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Alessandra Estrela Lima Orientadora  
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA

Documento assinado digitalmente  
 **ANGELICA CAVALHEIRO BERTAGNOLLI RODRIGI**  
Data: 03/12/2024 23:51:36-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Angélica Cavalheiro Bertagnolli Rodrigues Instituto de Pesquisas Veterinárias  
Desidério Finamor- IPVDF



Dr. Diego Carlos dos Reis  
Institute of Cancer Research (ICR)- London

Documento assinado digitalmente  
 **EUGENIA TERRA GRANADO PINA**  
Data: 12/12/2024 18:00:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Eugênia Terra Granado Pina Instituto Gonçalo Moniz -  
FIOCRUZ-BA

Documento assinado digitalmente  
 **SILVANA BEUTINGER MARCHIORO**  
Data: 02/12/2024 17:58:59-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Silvana Beutinger Marchioro Instituto de Ciências da Saúde-  
UFBA

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dra. Alessandra Estrela-Lima e coorientadora Dra. Karine Araújo Damasceno pelo apoio, carinho e disposição de ambas ao longo de todo o projeto.

A todos os membros do Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária da Universidade Federal da Bahia (NPqON – UFBA), estagiários, clínicos, cirurgiões, anestesistas, oncologistas e patologistas que contribuem diariamente pelo desenvolvimento de projetos tão importantes e principalmente zelam pela qualidade de vida das pacientes envolvidas.

Ao Instituto Gonçalo Muniz – (FIOCRUZ-BA) com as parcerias dos laboratórios LISD e LAPEC que permitiram a execução dos experimentos.

Ao Dr. Thiago Marconi (LAPEC) pela disponibilidade, paciência, ensinamentos e colaboração direta com projeto.

À doutoranda Thanielle Novaes Fontes e à mestranda Simone Nunes por todo apoio pessoal, auxílio com as coletas de amostras e trocas de conhecimentos.

À médica veterinária e amiga Marcela Renata dos Santos Gomes pelo apoio pessoal, emocional e incentivo durante toda a fase do doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos (PPGCAT), e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

PINTO, M.P.R. **Tumores mamários caninos: relação da versikina com o perfil linfocítico e o microambiente tumoral.** Salvador, 2024. 103p. Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos)

– Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2024.

Foram realizados dois experimentos distintos utilizando cadelas portadoras de carcinoma mamário, com o objetivo de avaliar a expressão da VKINA no microambiente tumoral e sua possível correlação com a resposta linfocítica e desfecho da doença em cadelas com tumores mamários malignos. No primeiro experimento foram selecionadas 65 cadelas divididas em quatro grupos: controle (GC: n=13), carcinomas mamários (CM: n=12), carcinomas em tumores mistos (CTM: n=33) e carcinossarcomas (CSS: n=7). As pacientes foram submetidas a avaliação clínica, laboratorial, mastectomia, realizada a caracterização clínico-patológica do tumor, morfologia do infiltrado inflamatório, imuno-histoquímica com marcação para VKINA, imunofenotipagem do sangue periférico e tumores por citometria de fluxo, além da análise de sobrevida. Os resultados indicam que em tumores mamários malignos de cadelas há predomínio intratumoral de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em relação aos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Em contrapartida, os tumores que possuem maior expressão de TCD8<sup>+</sup> apresentaram melhor prognóstico. A alta expressão de VKINA ( $\geq 120$ ) apresentou uma correlação direta com a graduação histológica e o TGF $\beta$ <sup>+</sup> mas ainda não pode ser considerada um marcador prognóstico independente. Em conclusão, a alta expressão de VKINA ( $\geq 120$ ) pode interferir na agressividade tumoral, e estudo das suas interações podem auxiliar na compreensão da sua capacidade imunomoduladora, sobretudo em diferentes tipos histológicos, trazendo novas perspectivas prognósticas e terapêuticas, tanto para cadelas quanto para as mulheres. No segundo experimento um total de 46 cadelas foram selecionadas e divididas em três grupos: controle (GC: n=13), CTM grau I (CTM I: n=22), CTM grau II/III (CTM: n=11). As pacientes foram submetidas a avaliação clínica, laboratorial, mastectomia, caracterização clínico-patológica do tumor, morfologia do infiltrado inflamatório intratumoral imunofenotipagem do sangue periférico e tumores por citometria de fluxo, avaliação de VKINA por imuno histoquímica, além da análise de sobrevida. Os resultados indicaram que o componente mesenquimal associado a matriz mixóide contribui para maior graduação, metástase nodal e menor sobrevida em CTM, a IL12 possivelmente auxilia o CTM I no combate tumoral, os tumores de maior agressividade (grau II/III), apresentaram maior infiltrado de TCD4<sup>+</sup> e TGF- $\beta$ <sup>+</sup> e expressão de VKINA na matriz extracelular. Assim, sugere-se que o CTM tem um microambiente característico dependendo do seu grau de agressividade. O componente mesenquimal, a alta expressão de TGF $\beta$ <sup>+</sup> e VKINA influenciam na agressividade do tumor, enquanto a IL12 em CTM I auxilia no combate tumoral. Esse é o primeiro estudo a trazer a relação da VKINA com IL12 e TGF $\beta$ <sup>+</sup> nesse subtipo histológico.

**Palavras-chave:** matriz extracelular, imunovigilância, linfócitos, câncer de mama, microambiente tumoral, matriquinas

## ABSTRACT

Two separate experiments were performed using bitches with mammary carcinoma to evaluate the expression of VKINA in the tumor microenvironment and its possible correlation with the lymphocytic response and disease outcome in bitches with malignant mammary tumors. In the first experiment, 65 bitches were divided into four groups: control (CG: n=13), mammary carcinomas (CM: n=12), carcinomas in mixed tumors (CMT: n=33), and carcinosarcomas (CSS: n=7). The patients underwent clinical and laboratory evaluation, mastectomy, clinical-pathological characterization of the tumor, morphology of the inflammatory infiltrate, immunohistochemistry with VKINA staining, and immunophenotyping of peripheral blood and tumors by flow cytometry, in addition to survival analysis. The results indicate that in malignant mammary tumors of bitches there is an intratumoral predominance of TCD4<sup>+</sup> lymphocytes about TCD8<sup>+</sup> lymphocytes. In contrast, tumors with higher expression of TCD8<sup>+</sup> presented a better prognosis. High expression of VKINA ( $\geq 120$ ) directly correlated with histological grading and TGF $\beta$ <sup>+</sup> but cannot yet be considered an independent prognostic marker. In conclusion, high expression of VKINA ( $\geq 120$ ) may interfere with tumor aggressiveness, and the study of its interactions may help in understanding its immunomodulatory capacity, especially in different histological types, bringing new prognostic and therapeutic perspectives, both for female dogs and for women. In the second experiment, a total of 46 female dogs were selected and divided into three groups: control (GC: n=13), CMT grade I (CMT I: n=22), and CMT grade II/III (CMT: n=11). The patients underwent clinical and laboratory evaluation, mastectomy, clinical-pathological characterization of the tumor, morphology of the intratumoral inflammatory infiltrate, immunophenotyping of peripheral blood and tumors by flow cytometry, and assessment of VKINA by immunohistochemistry, in addition to survival analysis. The results indicated that the mesenchymal component associated with the myxoid matrix contributes to higher grading, nodal metastasis, and lower survival in MSC, IL12 possibly helps CMT I in tumor combat, the most aggressive tumors (grade II/III) presented greater infiltration of TCD4<sup>+</sup> and TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, and expression of VKINA in the extracellular matrix. Thus, it is suggested that MSC has a characteristic microenvironment depending on its degree of aggressiveness. The mesenchymal component, the high expression of TGF $\beta$ <sup>+</sup>, and VKINA influence tumor aggressiveness, while IL12 in CMT I helps in tumor combat. This is the first study to show the relationship between VKINA and IL12 and TGF $\beta$ <sup>+</sup> in this histological subtype.

**Keywords:** extracellular matrix, immunosurveillance, lymphocytes, breast cancer, tumor microenvironment, matrikines

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<i>Tumores mamários caninos: relação da versikina com o perfil linfocítico e o microambiente tumoral.</i>		
<b>Figura 1</b>	Interação entre as células tumorais, os componentes da matriz extracelular, e os sistema imunológico nas diferentes fases da progressão tumoral.	25
<b>Figura 2</b>	Delineamento dos grupos controle e experimental.	30
<b>Figura 3</b>	Coleta e processamento de fragmentos tumorais para imunofenotipagem por citometria de fluxo	32
 <b>Artigo 1: <i>Versikina e sua Associação com a Agressividade Tumoral e Resposta Imune nos tumores mamários de cães</i></b>		
<b>Figura 1</b>	Perfil imune no sangue periférico de cadelas portadoras de neoplasia mamária.	45
<b>Figura 2</b>	Perfil imune do infiltrado tumoral de cadelas portadoras de neoplasia mamária.	46
<b>Figura 3</b>	Expressão de VKINA no estroma tumoral.	47
<b>Figura 4</b>	Correlação entre o escore de VKINA com a expressão de TGF $\beta$ <sup>+</sup> intratumoral.	48
<b>Figura 5</b>	Comparação do perfil imune de acordo com a mediana de VKINA.	50
<b>Figura 6</b>	Taxas de sobrevida.	51
 <b>Artigo 2: <i>Avaliação das diferenças do perfil imune, matriz extracelular e matriquina: relação com a agressividade tumoral nos carcinomas em tumores mistos mamário caninos</i></b>		
<b>Figura 1</b>	Análise da matriz intratumoral.	69
<b>Figura 2</b>	Perfil imune no sangue periférico de cadelas portadoras de Carcinomas em Tumores Mistos	70
<b>Figura 3</b>	Perfil imune no infiltrado tumoral de cadelas portadoras de Carcinomas em Tumores Mistos	72
<b>Figura 4</b>	Expressão de CD4/TGF $\beta$ <sup>+</sup>	73
<b>Figura 5</b>	Expressão de VKINA no estroma tumoral.	73
<b>Figura 6</b>	Correlação entre a expressão imunistoquímica de VKINA ( $\geq 140$ ), e os parâmetros clínico patológicos e subpopulações linfocíticas no sangue periférico e no infiltrado tumoral entre os grupos.	74
<b>Figura 7</b>	Taxas de sobrevida	75

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
<b><i>Tumores mamários caninos: relação da versikina com o perfil linfocítico e o microambiente tumoral</i></b>		
<b>Tabela 1</b>	Estadiamento clínico (TNM) – Classificação para tumores mamários de caninos de acordo com o Sistema TNM (modificado de OWEN, 1980)	17
<b>Tabela 2</b>	Anticorpos utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo	33
<b><i>Artigo 1: Versikina e sua Associação com a Agressividade Tumoral e Resposta Imune nos tumores mamários de cães</i></b>		
<b>Tabela 1</b>	Parâmetros clínico- patológicos das cadelas portadoras de neoplasia mamária	43
<b>Tabela 2</b>	Análise morfológica do infiltrado tumoral	44
<b>Tabela 3</b>	Perfil imune em sangue periférico	44
<b>Tabela 4</b>	Perfil imune no infiltrado tumoral	46
<b>Tabela 5</b>	Associação entre os parâmetros clínico-patológicos com base na mediana (120) da VKINA	48
<b>Tabela 6</b>	Correlação entre a expressão imunoistoquímica de VKINA $\geq 120$ com os parâmetros clínico independente dos grupos experimentais	49
<b>Tabela 7</b>	Análise univariada e multivariada do perfil linfocítico e parâmetros clínicos quando o escore de VKINA $\geq 120$ associados à sobrevida em cadelas portadoras de tumores mamários.	52
<b><i>Artigo 2: Avaliação das diferenças do perfil imune, matriz extracelular e matriquina: relação com a agressividade tumoral nos carcinomas em tumores mistos mamário caninos</i></b>		
<b>Tabela 1</b>	Parâmetros clínico-patológicos das cadelas portadoras de neoplasia mamária	68
<b>Tabela 2</b>	Avaliação do componente morfológico da matriz de CTM	69
<b>Tabela 3</b>	Análise morfológica do infiltrado tumoral	69
<b>Tabela 4</b>	Perfil imune em sangue periférico	70
<b>Tabela 5</b>	Perfil imune no infiltrado tumoral	71
<b>Tabela 6</b>	Análise univariada e multivariada do perfil linfocítico e parâmetros clínicos quando o escore de VKINA $\geq 140$ associados à sobrevida em cadelas portadoras de Carcinomas em Tumores Mistos	76

**LISTA DE ANEXOS**

	<b>Página</b>
<b>Anexo 1</b> Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido	99
<b>Anexo 2</b> Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	101
<b>Anexo 3</b> Ficha para exame clínico de pacientes com tumores mamários caninos	102

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1 NEOPLASIA MAMÁRIA	16
2.2 O SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA INTERAÇÃO COM O CÂNCER	18
2.3 MICROAMBIENTE TUMORAL	22
<b>3 OBJETIVOS</b>	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
<b>4 HIPÓTESE</b>	27
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
5.1 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO	28
5.2 INFRAESTRUTURA	28
5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
<b>5.3.1 Critérios de seleção</b>	28
<b>5.3.2 Critérios de inclusão</b>	28
<b>5.3.3 Critérios de exclusão</b>	29
<b>5.3.4 Delineamento do Estudo</b>	29
5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA E MASTECTOMIA	30
5.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA NEOPLASIA MAMÁRIA	30
5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TUMORAL	31
5.7 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	31
<b>5.7.1 Sangue periférico</b>	31
<b>5.7.2 Tumor mamário</b>	31
5.8 EXPRESSÃO DE VKINA	33
5.9 SOBREVIDA	34
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34

<b>6. RESULTADOS</b>	36
<i>ARTIGO 1: Relação da versikina com o perfil linfocítico e agressividade em tumores mamários caninos</i>	37
<b>Resumo</b>	38
<b>1. Introdução</b>	39
<b>2. Materiais e métodos</b>	40
2.1 Critérios de seleção, inclusão e exclusão.	40
2.2 Avaliação Clínica e Mastectomia	40
2.3 Classificação e graduação histológica	40
2.4 Análise morfológica do infiltrado tumoral	41
2.5 Imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo	41
2.5.1 Sangue periférico	41
2.5.2 Tumor mamário	41
2.6 Expressão de VKINA	42
2.7 Sobrevida	42
2.8 Análise estatística	42
<b>3 Resultados</b>	43
3.1 Características clínicas e patológicas	43
3.2 Análise morfológica do infiltrado tumoral	44
3.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do sangue periférico	44
3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do infiltrado tumoral	46
3.5 Expressão de VKINA	47
3.5.1. Relação entre VKINA e os parâmetros clínico-patológicos e perfil linfocítico	47
3.6 Análise de curvas de sobrevivência	51
3.7 Análise univariada e multivariada	52
<b>4 Discussão</b>	52
<b>5 Referências</b>	56
<i>ARTIGO 2: Avaliação das diferenças do perfil imune, matriz extracelular e matriquina: relação com a agressividade tumoral nos carcinomas em tumores mistos mamário caninos</i>	63
<b>Resumo</b>	64
<b>1. Introdução</b>	65

<b>2. Materiais e métodos</b>	66
2.1 Critérios de seleção, inclusão e exclusão.	66
2.2 Avaliação Clínica e Mastectomia	66
2.3 Classificação e graduação histológica	66
2.4 Análise do componente morfológico da matriz de CTM	67
2.5 Análise morfológica do infiltrado tumoral	67
2.6 Imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo	67
<b>2.6.1 Sangue periférico</b>	67
<b>2.6.2 Tumor mamário</b>	67
2.7 Expressão de VKINA	68
2.8 Sobrevida	68
2.9 Análise estatística	68
<b>3. Resultados</b>	69
3.1 Características clínicas e patológicas	69
3.2 Análise do componente morfológicos de matriz dos CTM	70
3.3 Análise morfológica do infiltrado tumoral	70
3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do sangue periférico	71
3.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do infiltrado tumoral	72
3.6 Expressão de VKINA	74
<b>3.6.1. Relação entre VKINA e os parâmetros clínico-patológicos e perfil linfocítico</b>	75
3.7 Análise de curvas de sobrevivência	76
3.8 Análise univariada e multivariada	77
<b>4. Discussão</b>	77
<b>5. Referências</b>	81
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	86
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	88
<b>9 ANEXOS</b>	99

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de modelos animais para o estudo de neoplasias humanas tem se mostrado uma abordagem valiosa na oncologia comparada e translacional (GRAY et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2023; KWON et al., 2023; VALENZA et al., 2023). Em particular, o modelo canino tem emergido como uma importante ferramenta para a investigação de tumores mamários, dada a sua alta incidência e semelhança com os tumores mamários humanos em termos de prevalência, etiologia, patogênese, classificação histopatológica, subtipos moleculares, heterogeneidade e perfis de mutação (PINHO et al., 2012; SALAS et al., 2015; NUNES, et al., 2018; GRAY et al., 2020; KWON et al., 2023).

É crescente o reconhecimento da relevância do microambiente tumoral na progressão e agressividade das neoplasias mamárias, tanto em humanos (EKICI et al., 2022; HANAMURA, et al., 2022; VALENZA et al., 2023), quanto em caninos ((DAMASCENO et al., 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2010). Um componente chave desse microambiente é o proteoglicano versican (VCAN), que, através da ação das enzimas ADAMTS (desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina), é convertido em um fragmento bioativo conhecido como versikina (VKINA) (WHIGT et al., 2014; NANDADASA et al., 2014; PAPADAS et al., 2020). A VKINA possui propriedades pró-apoptóticas e é capaz de induzir a expressão de citocinas inflamatórias, modulando o microambiente tumoral (McCULLOCH et al., 2009; HOPE et al., 2016). Desta forma, tanto o VCAN quanto a VKINA aparentemente, podem influenciar o potencial de agressividade tumoral (CHENG et al., 2020; DAMASCENO et al., 2012; LINDAHL et al., 2017; REIS et al., 2019).

Os dados observados na literatura atual sugerem que a VKINA pode influenciar a infiltração de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e a resposta inflamatória, fatores que estão diretamente relacionados à agressividade tumoral e ao prognóstico da doença (DAMASCENO et al., 2012; HOPE et al., 2016; DHAKAL et al., 2019). Em modelos de mieloma humano, a VKINA tem sido associada à indução de citocinas inflamatórias por macrófagos e à infiltração de linfócitos TCD8<sup>+</sup> anérgicos, o que sugere um papel complexo na interação entre células tumorais e o sistema imunológico (HOPE et al., 2016; DHAKAL et al., 2019). Em relação aos tumores mamários caninos, acredita-se que a VKINA pode estar relacionada aos processos iniciais de progressão tumoral, além de ter correlação direta com os Linfócitos Infiltrantes do Tumor (TILs) e células de sangue periférico (SOUZA et al., 2024 - *in press*). No entanto, os mecanismos pelos quais a

VKINA influencia a progressão tumoral e sua relação com as células imunes no microambiente tumoral ainda não estão completamente elucidados.

Desta forma, propõe-se avaliar a expressão de VKINA em tumores mamários caninos e sua correlação com o infiltrado inflamatório, agressividade tumoral e o desfecho clínico da doença. Este estudo pode contribuir para a compreensão dos mecanismos subjacentes à progressão tumoral em cães, e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em oncologia mamária humana.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 NEOPLASIA MAMÁRIA

O câncer de mama em mulheres apresenta alta frequência em todas as regiões do Brasil, com estimativa de 73.610 casos novos para o ano de 2023, o que representa uma taxa ajustada de incidência de 41,89 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2022). De forma semelhante, em cadelas a frequência de neoplasias mamárias malignas supera a incidência de 70% nessa espécie (CASSALI, 2000; PASTOR et al., 2018; NUNES, et al., 2018).

A doença em ambas as espécies compartilha aspectos semelhantes na sua prevalência, etiologia, patogênese, classificação histopatológica, subtipos moleculares, heterogeneidade e perfis de mutação (GRAY et al., 2020; KWON et al., 2023; PINHO et al., 2012; SALAS et al., 2015). No que se refere à etiologia dos tumores mamários de cadelas, há diversos fatores de risco que predis põem ao desenvolvimento da neoplasia, entre eles, os hormonais se destacam (SILVA et al., 2004; GARDEN et al., 2018; MUÑOZ-PIETRO et al., 2020), no entanto, também há influências de fontes genéticas, ambientais e nutricionais (ALENZA et al., 2000; CLEARY et al., 2010; SILVA et al., 2004).

Por conta da heterogeneidade morfológica e biológica, as neoplasias mamárias caninas passaram por diferentes classificações de acordo com as suas características histopatológicas (CASSALI et al., 2011; GOLDSCHMIDT et al., 2011; MISDORP et al., 1999; ZAPULLI et al., 2019) e a mais atual é a proposta por Cassali et al., 2020. Além da classificação histopatológica, o estadiamento, o grau do tumor, e conseqüentemente suas correlações têm sido utilizadas como fatores prognósticos importantes, a fim de situar o estágio da progressão tumoral, prever o risco de morte ou de recidiva e direcionar as terapias a serem instituídas (CASSALI, 2006).

Dentre a avaliação dos fatores prognósticos se faz importante o uso do estadiamento de tumores mamários caninos, estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020) e baseado no Sistema TNM, o qual considera o tamanho da lesão primária (T), extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), esses dados auxiliam o profissional no melhor planejamento terapêutico (CASSALI et al., 2014; OWEN, 1980).

O estadiamento é estratificado da seguinte forma: em relação ao tamanho, T1 são tumores menores que 3,0 cm; T2 são aqueles entre 3,0 e 5,0 cm e T3 são tumores maiores que 5,0 cm. A disseminação dos linfonodos regionais é classificada em N0 quando não há comprometimento e N1 quando há, e a metástase a distância em M0, quando ausente e M1, quando presente (SORENMO, 2003) (Tabela 1).

**Tabela 1. Estadiamento clínico (TNM) – Classificação para tumores mamários de caninos de acordo com o Sistema TNM (modificado de OWEN, 1980)**

T: Tamanho do Tumor	
T1	<3,0 cm
T2	3-5 cm
T3	>5 cm
N: Metástase para Linfonodo Regional	
N0	Ausente
N1	Presente
M: Metástase à distância	
M0	Ausente
M1	Presente

Fonte: Cassali et al. (2020) modificado de Owen (1980).

Em relação à graduação, historicamente o primeiro sistema utilizado para tumores mamários em mulheres foi o de Nottingham, estabelecido em 1973 e, posteriormente, modificado por Elston e Ellis, (1991). Nesse estudo, o sistema de escores foi utilizado para avaliar formação tubular: (escore 1 quando presente em mais de 75% do tumor, escore 2 quando em 10 a 75% e escore 3 quando em menos de 10%); o pleomorfismo nuclear: (escore 1 quando discreto, escore 2 quando moderado e escore 3 quando havia marcada variação) e contagem de mitoses em 10 campos considerando a área do microscópio, também com escores de 1 a 3. Em seguida, somam-se os escores, e valores entre 3 a 5, 6 a 7 e 8 a 9 pontos, o tumor recebe o grau I, II e III, respectivamente (ELSTON; ELLIS, 1991). Existem evidências de que este sistema de graduação histológica pode ser utilizado como parte de um indicador prognóstico também em cadelas (CASSALI et al., 2014; DAMASCENO et al., 2022; NUNES et al., 2022).

Devido às semelhanças biológicas, nas últimas duas décadas, os estudos com os tumores mamários caninos são comparáveis aos humanos, e têm potencial como modelo comparativo e translacional para a pesquisa de tumores de mama humanos (GRAY et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2023; KWON et al., 2023). A expectativa de vida mais curta dos cães e a natureza agressiva da doença permitem ensaios clínicos envolvendo novos agentes terapêuticos concluídos de maneira mais rápida, com menores custos, e com resultados compatíveis para as pacientes humanas (GRAY et al., 2020).

Assim, a possibilidade de estudos dentro do contexto da oncologia mamária comparada, promovem um maior conhecimento e respostas a respeito da etiologia, carcinogênese, prevenção, desenvolvimento de ensaios pré-clínicos, marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas, com avanços e benefícios para ambas as espécies (ABADIE et al. 2018; FERREIRA et al., 2023).

Além das semelhanças supracitadas, as pesquisas têm demonstrado que o microambiente tumoral desempenha um papel importante na etiopatogenia dos tumores mamários humanos e

caninos (DAMASCENO et al., 2012; EKICI et al., 2022; ESTRELA-LIMA et al., 2012; HANAMURA, et al., 2022; VALENZA et al., 2023).

## 2.2 O SISTEMA IMUNOLÓGICO E SUA INTERAÇÃO COM O CÂNCER

A interação do câncer com o sistema imunológico é ampla, complexa, e ainda hoje não há uma compreensão completa de todos os mecanismos e vias envolvidas. À medida que as pesquisas avançam, busca-se explicar como a inflamação contribui para a carcinogênese no que tange aos seus processos de transformação, progressão, desenvolvimento de metástases e recorrências, e o desenvolvimento de tratamentos direcionados a cada paciente (MUNN, 2016; PIOTROWSKI et al., 2020).

Alguns estudos sugerem que as interações ocorridas no microambiente de tumores mamários em cadelas tenham relação com o comportamento agressivo dessas neoplasias e processo inflamatório associado (BUJAK et al., 2020; CARVALHO et al., 2014; KIM et al., 2013; MURTA et al., 2000). A resposta imunológica e os mecanismos de evasão têm sido estudados por muitos anos. A tolerância associada a tumores, desenvolvimento anormal de células T reguladoras bem como o microambiente tumoral são fatores que impedem a resposta imune antitumoral (LIN et al., 2007).

Na fase inicial do desenvolvimento do câncer, a imunidade inata, composta por células *Natural Killers* (NKs) macrófagos, células dendríticas (DC), neutrófilos e o sistema complemento, associado a imunidade adaptativa com linfócitos ativados e anticorpos têm a capacidade de reconhecer a estrutura de antígenos não próprios com o objetivo de induzir uma resposta imune eficaz. Quando as células de ambos os sistemas respondem adequadamente no estágio inicial do câncer, as células cancerígenas podem ser removidas e o tecido retorna ao seu estado normal (MANJILI et al., 2006; SELLERI et al., 2007; KIM E CHO, 2022)

As células *Natural Killers* (NKs) quando ativadas, destroem as células tumorais pela liberação de perforinas, granzimas e a indução a apoptose pela expressão de ligante de fator de necrose tumoral relacionado a apoptose (TRAIL- *TNF-related apoptosis inducing ligand*) (NARENDRA et al., 2013). A perforina induz a formação de poros transmembranais nas células tumorais, permitindo a entrada das granzimas que, por sua vez, são proteases liberadas por exocitose e em contato com a célula-alvo cliva e ativa as caspases que induzem a apoptose dessas células (TORRENZINI e ATHANAZIO, 2007; GUAN et al., 2024).

No entanto, com a progressão da neoplasia, as células tumorais crescem e proliferam espontaneamente, geram variantes mais resistentes e criam estratégias que enganam o sistema imunológico, provocando um ambiente imunossuprimido de resposta imunológica, o que

caracteriza a fase de evasão (LABANI-MOTLAGH et al., 2020, TORREZINI e ATHANAZIO, 2007). Desta forma, as células tumorais constroem um microambiente favorável ao seu desenvolvimento (LABANI-MOTLAGH et al., 2020).

Essa fase é mediada por fatores intrínsecos como o bloqueio ou perda de antígenos tumorais, liberação de moléculas imunossupressoras como IL-10 e TGF- $\beta$ , diminuição da expressão de MHC-I, perda da expressão de coestimuladores e de MHC-II, ativação dos receptores inibitórios (PD-1), perda de moléculas de adesão e ativação do FAS. Há também fatores extrínsecos que incluem a atividade das células supressoras precursoras de origem mieloide, dos macrófagos associados a tumores, bem como o aumento das células supressoras no infiltrado tumoral (LABANI-MOTLAGH et al., 2020)

A avaliação dos TIL (Linfócitos Infiltrantes do Tumor) já foi realizada em adenocarcinoma colorretal humano e observou-se que baixas relações CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> estavam associadas a um melhor curso clínico, com sobrevida significativamente maior em 5 anos, independente do estágio e idade (DIEDERICHSEN et al., 2003). Os TIL também foram analisados em neoplasias bastante heterogêneas como os carcinomas renais, com resultados opostos, visto que o número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8 infiltradas dentro ou na periferia do tumor estavam diretamente relacionadas ao estágio, grau e atividade proliferativa (NAKANO et al., 2001).

Dentro do contexto de neoplasias heterogêneas, os carcinomas mamários ductais de mulheres com alta expressão de TIL TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> apresentaram menor sobrevida global, o que demonstra o valor prognóstico dos TIL (MATKOWSKI et al., 2009). O subtipo molecular pode influenciar nas diferentes densidades de células T CD8<sup>+</sup> e outros marcadores, como visto em tumores não luminiais, que são mais agressivos e apresentaram maior infiltração de células T. Esse resultado, mais uma vez, indicam um significado prognóstico que ainda precisa ser melhor validado (ALTHOBITI et al., 2018; MIYAN et al., 2016, OGIYA et al., 2016).

Em um estudo de meta-análise, a alta infiltração de TIL foi associada a uma maior sobrevida e previu uma resposta patológica completa, ou seja, a ausência de metástase em linfonodos e à distância, nas pacientes com subtipos moleculares triplo negativo (TNBC) e positivos para o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Por sua vez, quando altamente expresso em tumores do subtipo Luminal, apresentou sobrevida global mais curta (GAO et al., 2020).

Nos casos de carcinomas mamários ductais invasivos de mulheres em que havia metástase para linfonodo e os tumores eram maiores que dois centímetros, havia maior infiltração de células NK intratumorais e células TCD8<sup>+</sup> peritumorais. (VGENOPOULOU, et al., 2003). Já nos carcinomas ductais *in situ* da mulher, há uma densa quantidade de TIL que estão associados ao

maior tamanho do tumor, maior grau, necrose, ausência de receptor de estrogênio e menor tempo livre da doença, e possuem valor prognóstico independente e permitem um tratamento individualizado (TOSS et al., 2018).

Os TIL também atuaram como forte valor prognóstico clínico-patológico em mulheres com câncer de mama triplo negativo em estadios iniciais (LOI et al., 2019). Nos casos de câncer de mama invasivo de pacientes que recebiam terapia neoadjuvante, as células T CD3<sup>+</sup> avaliadas em sangue periférico, células NK, e principalmente T CD8<sup>+</sup> foram preditores independentes de resposta patológica completa, nesse caso, caracterizado como regressão total do tumor primário (FENG et al., 2022). Dessa forma, essa análise fornece preditores não invasivos, precisos e facilmente acessíveis, além de compreender melhor a imunidade do tumor (FENG et al., 2022).

Em sítios metastáticos de tumores de mama, houve menor infiltração de linfócitos do que nos sítios primários, e esse dado relacionou-se com a menor sobrevida das pacientes (OGIYA et al., 2016). Resultado semelhante foi observado com pacientes em quimioterapia, também demonstrando correlação entre a baixa infiltração de TIL e mau prognóstico (YAZAKI et al., 2023). Quando avaliado apenas lesões malignas e benignas, sem distinção quanto ao perfil molecular, houve maior população de linfócitos T CD45<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> em tumores malignos e menor de T CD8<sup>+</sup> (COPPOLA et al., 2022).

Em cadelas a maior frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> foi associada à ocorrência de metástase, enquanto a maior frequência dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> foi observada nos tumores de melhor prognóstico e sem metástases (ESTRELA-LIMA et al., 2010). Esse estudo sugere que linfócitos TCD4<sup>+</sup> auxiliam na evolução neoplásica enquanto TCD8<sup>+</sup> combatem o desenvolvimento tumoral (ESTRELA-LIMA et al., 2010). Já em carcinomas inflamatórios mamários (CIM), de forma interessante, foi observado que os linfócitos TCD8<sup>+</sup> indicaram aumento da malignidade assim como a menor sobrevida dessas cadelas (DAMASCENO et al., 2022). Nos carcinomas em arranjo sólido o grau de inflamação não foi associado ao tipo histológico e imunofenótipo tumoral. No entanto, animais com maior inflamação peri e intratumoral tiveram uma taxa significativamente maior de metástase para linfonodos regionais, o que foi um fator independente para o risco de morte (FLECHER et al., 2024).

Em câncer de mama metastático, a alta quantidade de linfócitos T circulantes (sangue periférico) correlacionaram-se significativamente com o prognóstico e a eficácia terapêutica no subtipo de amplificação HER2, porém isso não foi observado no subtipo luminal ou triplo negativo. Isso sugere que o valor prognóstico dos linfócitos T circulantes para tumor de mama metastático é semelhante ao dos TIL para tumores de mama precoce, pois ambos estão relacionados a subtipos moleculares específicos (YANG et al., 2019). Os mesmos autores

observaram ainda que os linfócitos TCD4<sup>+</sup> estavam associados à sobrevida livre da doença. Os TIL representam um biomarcador prognóstico e preditivo promissor e barato a ser validado prospectivamente em ensaios clínicos, o que pode ajudar os médicos a selecionar pacientes com tumores de mama que possam responder melhor à imunoterapia ou à redução de quimioterapias (VALENZA et al., 2023).

Os macrófagos associados a tumores (TAMs) também são componentes predominantes no microambiente tumoral e geralmente estão associados ao mau prognóstico de tumores sólidos (RUFFELL et al., 2012), como observado em câncer de mama, no qual a maior infiltração de macrófagos do tipo 2 (M2), esteve associada à progressão tumoral (JEONG et al., 2019).

Em cães existe a necessidade de entender os mecanismos biológicos que controlam os estados de polarização dos macrófagos caninos, por isso, um estudo *in vitro* observou que IFN- $\gamma$  é capaz de estimular macrófagos M1, enquanto que IL-4 e IL-13 estimulam macrófagos M2, de forma que permite compreender melhor a biologia de macrófagos nessa espécie (CHOW et al., 2022).

A arginase 1 (ARG1) é classicamente considerado um “marcador” do estado antiinflamatório (M2) e as células que expressam ARG1 no tecido tumoral são, principalmente, células supressoras derivadas de mieloides imaturas e monocíticas, o que sugere um importante mecanismo de imunossupressão e evasão tumoral (REN et al., 2020). Em câncer de pâncreas, a maior infiltração de ARG1 em macrófagos esteve correlacionada com a pior sobrevida, predominantemente expressa em macrófagos, e ainda inibiu a ativação de células TCD8<sup>+</sup>, o que pode refletir a inibição da arginase como uma estratégia terapêutica (MENJIVAR et al., 2023).

Em carcinomas pulmonares observou-se que inibição da arginase combinada a outras estratégias de tratamento, pode aumentar a sobrevida dos pacientes (SOSNOWSKA et al., 2021). Por outro lado, no câncer de mama humano a arginase foi fortemente correlacionada com tumores de alto grau, pior prognóstico e menor sobrevida, assim a arginase pode atuar como um marcador prognóstico independente para avaliar o risco de metástase em pacientes com câncer de mama (BOKIL, et al., 2023).

Tem-se observado que ARG1 é um marcador altamente sensível e específico em hepatócitos caninos, semelhante aos humanos, e a redução da sua expressão tem sido associada à carcinomas hepatocelulares caninos, e são alvos de estudos como marcadores potenciais na diferenciação de carcinomas hepatocelulares de lesões hepáticas não neoplásicas em cães (KIM et al., 2021)

Dessa forma, os dados obtidos na literatura oncológica tanto de humanos quanto de cadelas, encorajam as pesquisas que estudam a interação das células tumorais com os componentes do

sistema imunológicos para o desenvolvimento das imunoterapias (GRETEN e GRIVENNIKOV, 2019; MAEKAWA et al., 2016). Além disso, o modelo canino pode auxiliar na oncologia comparada e abrir perspectivas nos estudos de neoplasia mamárias em mulheres (FERREIRA et al., 2023; GRAY et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2023; KWON et al., 2023; VALENZA et al., 2023). Por isso, é fundamental compreender o papel que as vias imunológicas e inflamatórias exercem nas resistências às terapias.

### 2.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

O microambiente tumoral compreende às células do tumor, membrana basal, células endoteliais, adiposas, neuroendócrinas, fibroblastos, células imunes infiltrantes do tumor e a matriz extracelular (MEC), além uma infinidade de moléculas sinalizadoras como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento que regulam a progressão do tumor (NEOPHYTOU et al., 2021).

A função desses componentes imunes e as moléculas por eles expressas é interferir na evolução e crescimento tumoral, além disso, a composição total de células imunes no microambiente não é polarizada em 'antitumor' ou 'pró-tumor', mas sim uma combinação desses tipos celulares. (GIRALDO et al., 2019).

Dessa forma, TIL CD8<sup>+</sup> e NK são importantes no combate antitumoral, enquanto que macrófagos M2 podem promover a proliferação tumoral; as células tumorais estimulam a expressão moléculas imunomoduladoras, competem e moldam nutrientes; e a MEC e células do estroma possuem baixa capacidade de recrutamento de células T, os fibroblastos atuam como imunossupressores e uma barreira física contra agentes quimioterápicos (GIRALDO et al., 2019).

No câncer de mama, o microambiente é subdividido em níveis local (intratumoral), composto pelas células tumorais e das células inflamatórias infiltrantes do tumor, incluindo linfócitos, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos; regional (mamário) que se refere à interação entre as células tumorais e as células adjacentes no estroma, como fibroblastos, células mioepiteliais, endoteliais e adipócitos, e por fim, o nível metastático (distante) que inclui às células hospedeiras nos linfonodos e órgãos distantes, formando novos microambientes (SOYSAL et al., 2015; LI e TSE, 2021)

A MEC caracteriza-se com uma rede de proteínas extracelulares e outras macromoléculas, incluindo colágeno, fibronectina, hialuronano, elastina, integrinas, proteínas microfibrilares e glicosaminoglicanos e proteoglicanos que fornecem suporte estrutural e bioquímico ao tecido, e exercem papéis determinantes favorecendo ou inibindo a progressão tumoral e metástase (FRANTZ et al., 2010).

As interações ocorridas entre as células tumorais, a modulação com o sistema imunológico e os componentes da matriz extracelular são alvos de estudos recentes (GRETEN e GRIVENNIKOV, 2019; EBLE e NILAND, 2019; HARTMANN et al., 2014; MAEKAWA et al., 2016). Dentre os componentes da matriz extracelular, os proteoglicanos desempenham importante papel na carcinogênese, diante da sua versatilidade e capacidade de interagir com muitos receptores celulares (LINDAHL et al., 2017). São moléculas secretadas no estroma, por fibroblastos associados ao câncer ou até mesmo pelas próprias células tumorais (NABA et al., 2014), e atuam na biodisponibilidade de fatores de crescimento, hormonais e citocinas (NIKITOVIC et al., 2014).

Dentre os proteoglicanos importantes, o versican (VCAN) atua no desenvolvimento embrionário, em condições normais, mas também participa de diversos processos patológicos, sejam inflamatórios ou neoplásicos (WHIGT et al., 2014). O VCAN contém vários domínios ativos, sendo constituída por um domínio N-terminal (G1), ligado ao ácido hialurônico (AH), domínio C-terminal (G3) que contém domínios tipo lectina, dois domínios de fator de crescimento epidermal e um domínio regulatório de complemento (MATSUMOTO et al., 2003; RICCIARDELLI et al., 2009).

Além disso, o VCAN pode gerar quatro isoformas, denominadas v0, v1, v2 e v3 (FREY et al., 2013) que atuam realizando a ligação entre moléculas da matriz e da célula, além de desempenhar um papel central na montagem da matriz pericelular (ERDÉLYI et al., 2005). Já foi demonstrado que o VCAN associado ao tumor induziu à disfunção de células dendríticas por meio da ativação do receptor *Toll-like 2*, pela regulação de interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10) (TANG et al., 2015). Em neoplasias gástricas humanas a alta expressão de versican esteve relacionada à maior chance de recidiva e menor sobrevida global, o que demonstrou seu potencial como marcador prognóstico (CHENG et al., 2020).

A desregulação da matriz extracelular envolvendo o VCAN facilita o crescimento excessivo do tumor, invasão e metástase (EBLE e NILAND, 2019), além de implicar na modulação de células TCD8<sup>+</sup>, no microambiente tumoral, de forma que as células TCD8<sup>+</sup> interagem com as fibras de colágeno para facilitar sua migração e invasão (HARTMANN et al., 2014). No mesoteliomas o VCAN promoveu a progressão tumoral e permitiu a migração de macrófagos polarizados em M2 (pró tumoral), de forma a proteger as células cancerígenas na fagocitose via macrófagos (PAPPAS et al., 2019).

Em tumores mamários canino e murinos os resultados revelaram uma associação do VCAN em estroma com a maior quantidade de macrófagos associados ao tumor nos casos de neoplasias em estadios avançados, o que demonstra sua ação pró inflamatória e pró angiogênica (KODAMA et

al., 2007; REIS et al., 2019; YEE et al., 2007; SANTOS, 2023). Também em cadelas, o VCAN e os receptores de superfície celular como HER-2, HER-3 e CD44 apresentaram maior infiltração em carcinossarcomas, demonstrando a relação dessas moléculas com a invasividade e pior prognóstico (DAMASCENO et al., 2015). Em carcinomas mamários e carcinoma em tumores mistos caninos também foi evidenciado alta expressão de VCAN, de forma que esteve associada à invasividade em desses subtipos histológicos (FIGUEREDO, et al., 2021).

A isoforma V1 de VCAN também pode sofrer proteólise por enzimas tipo metaloproteinase da família ADAMTS (desintegrina e metaloproteinase com domínios trombospondina), gerando uma matricina bioativa, a versikina (VKINA) (NANDADASA et al., 2014), uma molécula que também está envolvida no desenvolvimento de órgãos (TIMMS e MAURICE, 2020), na migração e proliferação celular durante os processos de desenvolvimento e na cicatrização de feridas em muitos tecidos (PAPADAS et al., 2020), Além disso, também apresenta uma ação pró apoptótica e indutora de expressão de citocinas (McCULLOCH et al., 2009; HOPE et al., 2016; REIS et al., 2019).

As matriquinas oriundas do VCAN, de maneira geral, podem controlar processos biológicos, como angiogênese, migração celular, adesão e diferenciação, além do crescimento tumoral e metástase (POPOVA e JÜCKER, 2022). A VKINA purificada induziu a expressão precoce de citocinas inflamatórias como interleucina 1b e 6 (IL-1b e IL-6) por macrófagos associados ao mieloma humano e ativação de mediadores quimiotáticos de células T (HOPE et al., 2016). Nos casos de mielomas após transplante, a VKINA estimulou a infiltração de linfócitos TCD8<sup>+</sup>, disfuncionais ou fracamente imunorreguladores no local do tumor, visto que se observou quadros recidivantes nos pacientes e risco de morte precoce (DHAKAL et al., 2019).

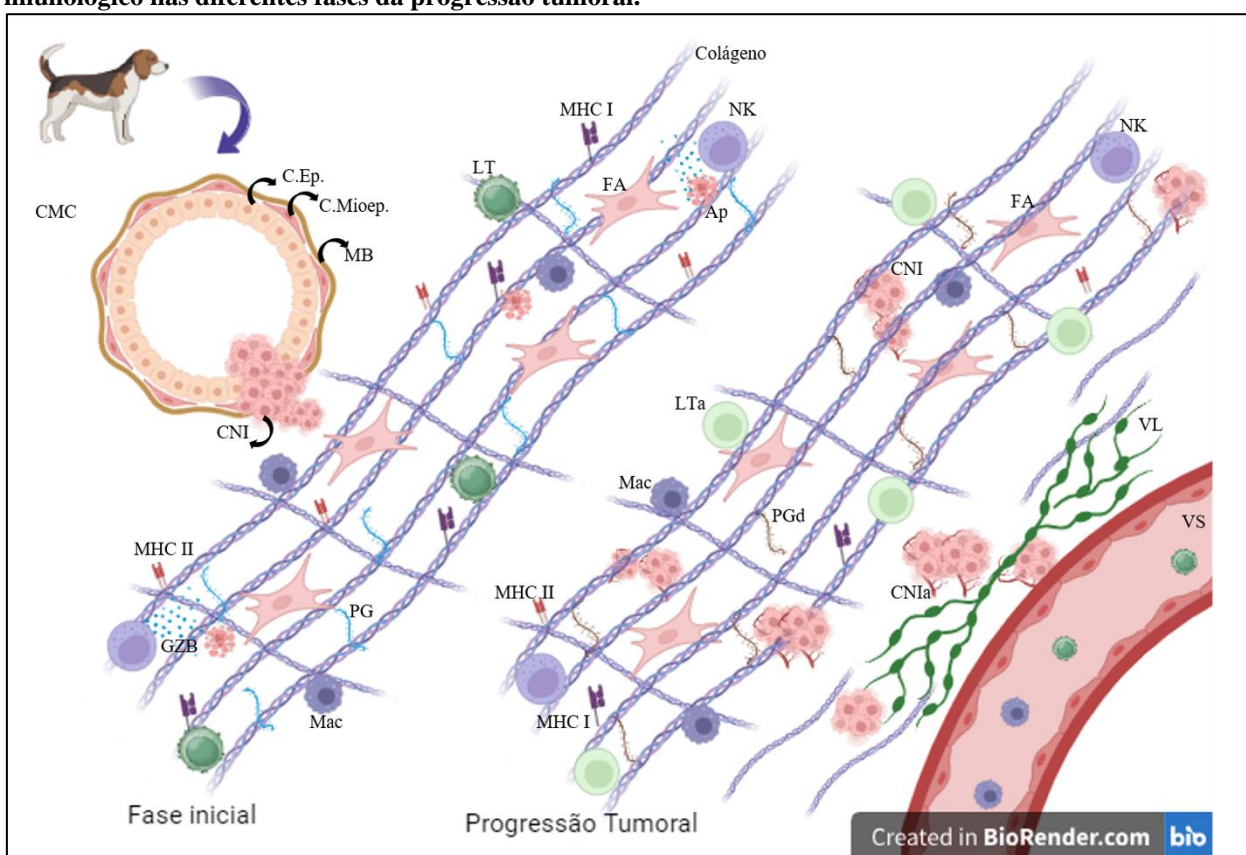
No câncer colorretal os altos níveis de VKINA correlacionaram-se com o aumento da infiltração de TIL CD8<sup>+</sup> (KRAUS et al., 2022) e no modelo murino, a VKINA apresentou relação com perfil imune predominantemente anti-inflamatório, criando um microambiente favorável a progressão do tumor (SANTOS, 2023). De maneira semelhante ao observado em cadelas com câncer de mama, no qual a VKINA esteve relacionada invasividade de células neoplásicas, maior grau histológico e menor tempo de sobrevivência (SOUZA et al., 2024 - *in press*).

Assim, todos esses estudos sugerem um provável valor prognóstico da VKINA, no entanto, o mecanismo de influência da proteólise na imunomodulação das neoplasias não está totalmente esclarecido (WIGHT et al., 2020; REDONDO-GARCÍA et al., 2021). A maioria dos estudos retratam que tanto o VCAN quanto sua forma degradada, a VKINA, apresentam interferência no microambiente tumoral, geralmente a favor da progressão do tumoral (DHAKAL et al., 2019; CHENG et al., 2020; KRAUS et al., 2022; PAPPAS et al., 2019), no entanto, o VCAN tem sido

considerado uma "molécula-chave", com atividades pró e anti-inflamatórias dependendo do contexto em que é apresentado às células, da fase inicial ou terminal da doença e da sua versatilidade em se ligar a múltiplos receptores (WIGHT et al., 2020)

Atualmente, é crescente o número de estudos direcionados ao entendimento do microambiente tumoral, seus componentes e interações. Dessa forma, conhecer a influência desses proteoglicanos e subprodutos na matriz extracelular se torna fundamental para compreender melhor o comportamento da neoplasia e buscar terapêuticas individualizadas. A interação entre as células tumorais mamárias e os componentes da matriz extracelular estão ilustrados na figura 1.

**Figura 1. Interação entre as células tumorais, os componentes da matriz extra celular, e os sistema imunológico nas diferentes fases da progressão tumoral.**



**Legenda:** CMC: Carcinoma Mamário Canino. C.EP.: Células epiteliais. C.Mioep: Células mioepiteliais. MB: Membrana basal. CNI: Células neoplásicas invasoras. MHC I: Moléculas de MHC classe I. MHC II: Moléculas de MHC classe II. NK: Células *Natural Killer*. FA: Fibroblasto ativado. LT: Linfócitos T. Ap: Apoptose de células tumoral. PG: Proteoglicano. Mac: Macrófago. GZB: Granzimas. LTa: Linfócitos T anérgicos. PGd: Proteoglicano degradado. CNIa: Células neoplásicas invasoras com angiogênese. VL: Vaso linfático. VS: Vaso sanguíneo. Ilustração criada pela autora com o uso do *software* Biorender.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expressão da VKINA e sua relação com agressividade tumoral, infiltrado inflamatório e a taxa de sobrevida em cadelas com tumores mamários malignos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliar a expressão de VKINA no microambiente tumoral, em diferentes tipos de tumores malignos da cadela;
- ✓ Avaliar e correlacionar o perfil imune em tumores mamários malignos da cadela;
- ✓ Verificar possíveis correlações da expressão da VKINA com fatores prognósticos (tamanho tumoral, estadiamento clínico e grau histopatológico) em tumores mamários malignos da cadela;
- ✓ Correlacionar a expressão da VKINA com perfil imune em tumores mamários malignos da cadela;
- ✓ Avaliar a expressão de VKINA em relação a sobrevida em cadelas com tumores mamários malignos.

#### **4 HIPÓTESE**

A expressão de VKINA no microambiente tumoral resulta em uma resposta antitumoral mediada por T CD8<sup>+</sup> ativos e maior sobrevida em cadelas com tumores mamários malignos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO

Todos os responsáveis pelos animais foram previamente informados sobre os procedimentos e etapas diagnósticas e terapêuticas previstas e autorizaram a realização do projeto de pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com número de protocolo 16/2021 (Anexo 2).

### 5.2 INFRAESTRUTURA

A pesquisa foi desenvolvida no Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodenburg de Medeiros Netto (HOSPMEV/UFBA) com participação dos setores de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, Laboratório de Patologia Veterinária e, parceria com a Laboratório de Investigação em Saúde Global e Doenças Negligenciadas (LISD) do Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz-Bahia (IGM/FIOCRUZ-BA).

### 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1 Critérios de seleção

No período de agosto de 2022 a maio de 2023 foram atendidas 165 cadelas com tumor mamário pelos profissionais do Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária – NPqOM/HOSPMEV/UFBA. Deste total, observados critérios de exclusão e inclusão, foram selecionadas para compor o grupo experimental, 52 cadelas de diferentes raças, idades e portes, aptas à realização da mastectomia unilateral. Além das cadelas com tumor mamário, foram selecionadas durante checkup de rotina 13 cadelas saudáveis, domiciliada para compor o grupo controle, totalizando 65 cadelas avaliadas.

#### 5.3.2 Critérios de inclusão

Grupo controle - cadelas adultas, de diferentes raças e portes, sem histórico de neoplasia de qualquer origem, ou doenças concomitantes (infecciosas/autoimunes).

Grupo experimental - cadelas adultas, de diferentes raças e portes, portadoras de tumores mamários operáveis, diagnóstico de neoplasias malignas, sem histórico de doenças concomitantes (infecciosas/autoimunes).

### **5.3.3 Critérios de exclusão**

Foram considerados nos critérios de exclusão, a presença de outros tipos de tumores detectados durante o processo de seleção/estudo ou doenças concomitantes (infecciosas/autoimunes); cadelas com neoplasia em ambas as cadeias mamárias, tumores mamários menores que 1,0 cm, e os casos em que a amostra colhida durante a cirurgia não representava, de acordo com a classificação histopatológica (CASSALI et al., 2020), o tumor de pior prognóstico.

### **5.3.4 Delineamento do Estudo**

Atendidos os critérios de seleção, inclusão e exclusão, as 65 cadelas foram alocadas em 4 grupos, de acordo com o tipo histológico listados abaixo. O delineamento experimental pode ser evidenciado na figura 2.

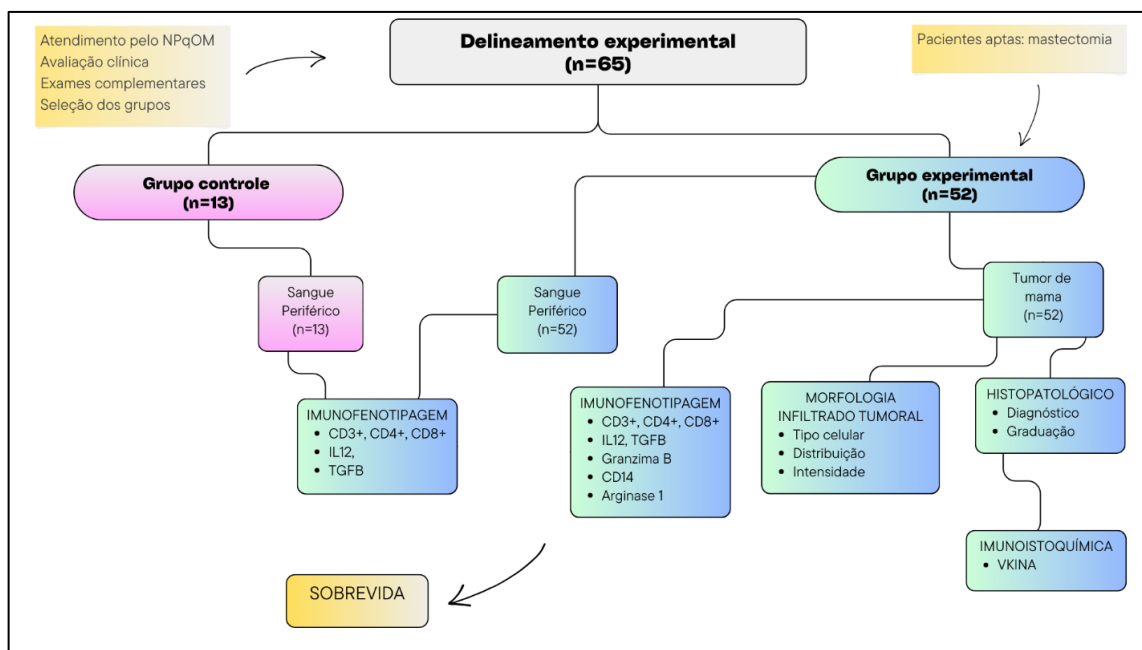
GRUPO CONTROLE (GC) – 13 animais saudáveis, sem tumores mamários. Colheita apenas de sangue periférico.

GRUPO DE CARCINOMAS EM TUMORES MISTOS (CTM) – 33 animais. Tumores mamários com porção epitelial maligna e porção mioepitelial benigna produtora de matriz mixóide e/ou condróide e/ou osteóide.

GRUPO DE CARCINOMAS MAMÁRIOS (CM) – 12 animais. Tumores mamários com porção epitelial maligna.

GRUPO DE CARCINOSSARCOMAS (CSS) – 7 animais. Tumores mamários com componentes carcinomatosos e sarcomatosos (proliferação mesenquimal maligna).

**Figura 2. Delineamento dos grupos controle e experimental**



#### 5.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA E MASTECTOMIA

Todas as cadelas com suspeita/queixa de neoplasia mamária foram submetidas ao exame que constou inicialmente da anamnese. Em seguida, foi realizado o exame físico completo, e o exame específico das glândulas mamárias com a palpação de toda cadeia mamária, assim como dos linfonodos inguinais e axilares, com conseqüente mapeamento e mensuração dos nódulos transcritos na ficha de avaliação oncológica específica (Anexo 3).

Foram realizados exames de sangue (hemograma e bioquímica sérica), de imagem para pesquisa de metástase como radiografias torácicas em dimensões (latero-laterais direita e esquerda e ventro-dorsal) e ultrassom abdominal, eletro e ecocardiograma para avaliação geral e condução do protocolo anestésico. Após avaliação dos resultados dos exames, as cadelas aptas foram submetidas à exérese cirúrgica da cadeia mamária acometida e linfonodos regionais. O estadiamento foi realizado baseado na medida do maior tumor invasivo, de acordo com os critérios adotados pelo sistema TNM (OWEN, 1980).

#### 5.5 CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA NEOPLASIA MAMÁRIA

Após a finalização do procedimento cirúrgico, a cadeia mamária foi acondicionada em frasco identificado contendo formol neutro e tamponado com fosfato a 10%, e encaminhada ao Laboratório de Patologia Veterinária para caracterização macro e microscópica pela técnica rotineira de inclusão em parafina (PROPHET, et al., 1992). Concluída a etapa de processamento da

amostra, os cortes histológicos de 4µm foram corados pelas técnicas da hematoxilina-eosina (H.E.) e analisados em microscópio convencional. A análise das lâminas histopatológicas foi submetida à leitura por dois patologistas veterinários que seguiram os critérios da classificação do consenso realizado por Cassali et al. (2020). Para a graduação histológica, foi utilizado o grau histológico de Nottingham, que inclui percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico (ELSTON e ELLIS, 1991).

## 5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TUMORAL

A análise dos aspectos morfológicos foi realizada em cortes histológicos de 4 µm corados com HE e a reação inflamatória classificada pelo tipo celular predominante, distribuição e pela intensidade. O tipo inflamatório foi classificado como: i) linfocítico; ii) histiocítico. A distribuição dos infiltrados inflamatórios foi avaliada e classificada em: i) focal: presença de 1 a 3 focos inflamatórios; ii) multifocal: presença de mais de 3 focos inflamatórios e iii) difuso: presença de células inflamatórias distribuídas uniformemente na secção tumoral. A intensidade da reação inflamatória foi categorizada em três subgrupos (discreta, moderada ou intensa) com base na análise morfométrica do infiltrado inflamatório total. (ESTRELA-LIMA et al, 2010).

## 5.7 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

### 5.7.1 Sangue periférico

Para determinar as frequências de células inteiras no sangue periférico, foram utilizadas 65 amostras, (13 do grupo controle e 52 do grupo experimental) coletadas em EDTA (2 mL), adicionado em meio de cultura celular RPMI 1640, seguido de lise utilizando tampão de lise ACK (BD Biosciences CA) durante 10 minutos e lavado duas vezes com PBS 1x (Sigma, St. Louis, MO) por centrifugação a 300 xg. As células foram ajustadas a uma concentração de 5 x 10<sup>5</sup> células/mL em tubos de polipropileno para marcação com anticorpos monoclonais produzido em ovelhas com reatividade contra antígenos caninos, α-CD3-FITC (clone CA17.2A12), α-CD4-RPE 1:320 (rato-IgG2a, clone YKIX302.9) e α-CD8-AlexaFluor 647 1:40 (rato-IgG1, clone YCATE55.9), para determinação das subpopulações linfocítica; e IL12-PE 1:100 e TGFβ-1-APC 1:100 para determinação de citocinas inflamatórias (Invitrogen, Elabsciesce, Bio-Rad Laboratories California, EUA)

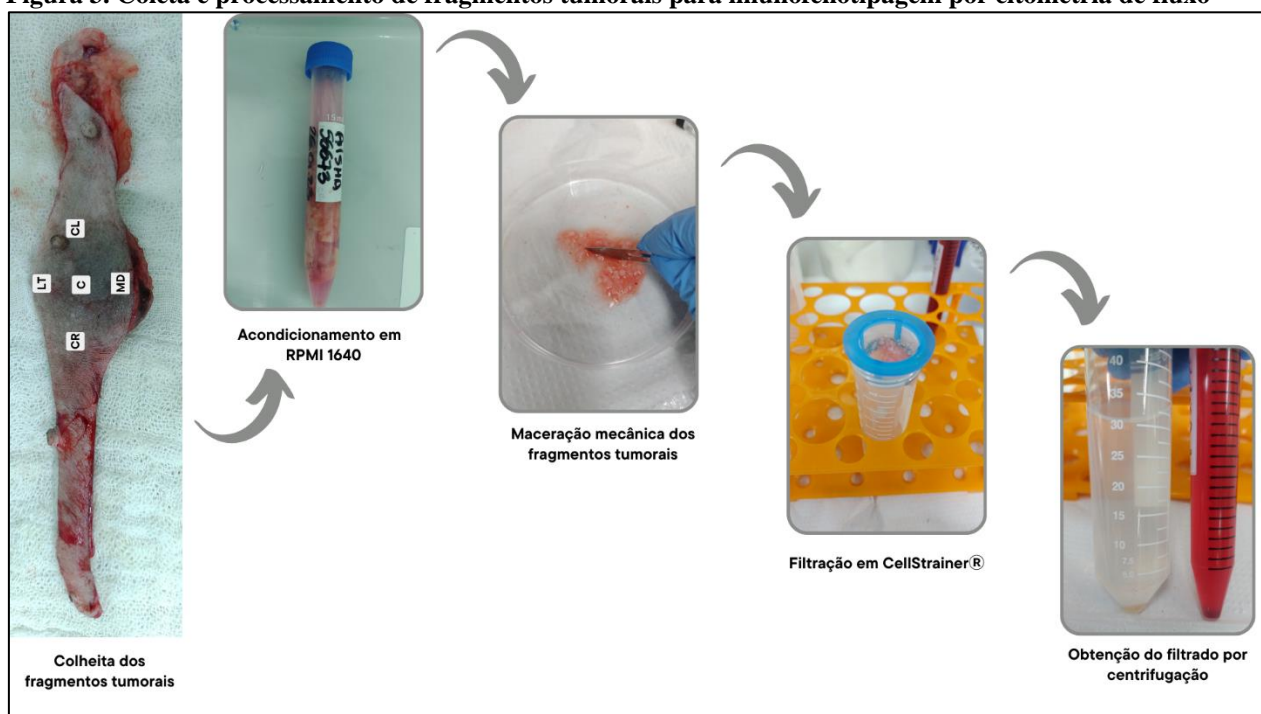
### 5.7.2 Tumor mamário

Foram colhidos cinco fragmentos tumorais de 1 cm<sup>3</sup> (n=52) representativos de áreas peri/intratumorais (DAMASCENO et al., 2022) para análise imunofenotípica por citometria de

fluxo, de todas as pacientes dos grupos experimentais. Os fragmentos representavam as regiões cranial, caudal, medial, lateral e central do tumor em relação a cadeia mamária. Os fragmentos foram acondicionados em meio 5 mL de cultura celular RPMI 1640.

Os fragmentos dos tumores foram macerados mecanicamente seguido de filtração em Falcon de 50 $\mu$ m para purificação das células. Foi realizado a lavagem duas vezes com PBS 1X e quantificadas para  $1 \times 10^6$  células/mL colhidas em PBS seguido pela etapa de marcação celular (**Figura 3**).

**Figura 3. Coleta e processamento de fragmentos tumorais para imunofenotipagem por citometria de fluxo**



**Legenda:** CR: Cranial; CL: Caudal; MD: Medial; LT: Lateral, C: Central

Para a marcação das células tumorais foram utilizados anticorpos monoclonais hospedados em ovinos com reatividade canina:  $\alpha$ -CD3-FITC (clone CA17.2A12),  $\alpha$ -CD4-RPE 1:320 (rato-IgG2a, clone YKIX302.9) e  $\alpha$ -CD8-AlexaFluor 647 1:40 (rato-IgG1, clone YCATE55.9); Granzima B – Alexa Fluor 1:100 para determinação das subpopulações linfocítica; e IL12-PE 1:100; TGF $\beta$ -1-APC 1:100; para determinação das citocinas inflamatórias, CD14-APC 1:100; Arginase-PE 1:100 para determinação de monócitos (Invitrogen, Elabscience, Bio-Rad Laboratories California, EUA) (tabela 2).

**Tabela 2. Anticorpos utilizados para imunofenotipagem por citometria de fluxo.**

<b>Amostras marcadas</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Diluição</b>
<b>Sangue periférico e tumor</b>	CD3	FITC	1:320
	CD4	RPE	1:40
	CD8	Alexa fluor	1;40
	IL12	PE	1:100
	TGFβ-1	APC	1:100
<b>Tumor</b>	CD14	APC	1:100
	Granzima	Alexa Fluor	1:100
	Arginase	PE	1:100

Após todo o procedimento de marcação da fenotipagem tanto do sangue periférico e do tumor, as medidas citométricas de fluxo foram realizadas em um instrumento FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada primeiro controlando populações de linfócitos com base nas propriedades de dispersão direta (FSC) versus dispersão lateral (SSC). As características imunofenotípicas foram analisadas em gráficos de pontos FL1/FITC de duas cores versus FL2/R-PE. A análise da citometria de fluxo foi realizada utilizando o pacote Cell Quest™ Software e o programa FlowJo 7.6.5

### 5.8 EXPRESSÃO DE VKINA

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, secções de 4µm foram obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas silanizadas (StarFrost). As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em uma série gradual de etanol e submetidas à tratamento enzimático por meio citrato-EDTA. 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 anti-DPEAAE, policlonal em diluição de 1:500, 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 (DAB) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Como controles positivos foram usadas amostras de tumor mamário previamente testado. A expressão

de VKINA em áreas perivasculares foi considerada como controle interno positivo (ASANO et al., 2017). Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

A imunomarcção de VKINA foi avaliada segundo Damasceno et al. (2012), por meio de escala semiquantitativa no estroma peritumoral adjacente, tanto *in situ* quanto em áreas invasivas de proliferação de células epiteliais malignas, considerando (i) a porcentagem total de tecido corado positivamente (0–100%) e (ii) a intensidade de coloração para o proteoglicano. De acordo com a escala, (1) foi considerado negativo ou pouco corado, (2) fraco, (3) moderado e (4) forte. O escore imuno-histoquímico da expressão foi calculado multiplicando-se a porcentagem de tecido corado (0–100%) pela intensidade da coloração (1–4).

### 5.9. SOBREVIDA

A taxa de sobrevida global foi definida como o período (em dias) entre a excisão cirúrgica do tumor primário e a data do óbito ou a data de conclusão do estudo. A sobrevivência global dos animais foi verificada, a partir de retornos presenciais periódicos para avaliação clínica e realização de exames de acompanhamento, com a equipe do Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária (NPqOM) e por meio de telefonemas aos tutores realizados ao final do experimento.

As pacientes que evoluíram ao óbito, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFBA, para realização de exame necroscópico e colheita de fragmentos dos órgãos para análise histopatológica, visando determinar a causa da morte e identificar as possíveis metástases. Os animais em que os tutores não seguiram em acompanhamento, ou que houve perda de contato, não foram incluídos na análise de sobrevida.

### 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste exato de Fisher foi realizado para verificar a significância das associações presuntivas entre variáveis. Os dados foram agrupados da seguinte forma: diagnóstico histológico (CM, CTM, CSS); tamanho do tumor (<5,0 ou  $\geq 5$  cm); metástase linfonodal (não ou sim); metástase pulmonar (não ou sim); estadiamento clínico (I-III ou IV-V); grau histológico grau (I, II ou III); distribuição da inflamação (focal, multifocal ou difusa) e intensidade da inflamação (discreta, moderada ou intensa)

Para variáveis quantitativas, o teste de Kolmogorov-Smirnov avaliou inicialmente a normalidade da distribuição. Em seguida, as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelos testes t de Student/U e Wilcoxon (quando dois grupos foram comparados) ou ANOVA/teste de Kruskal-Wallis (mais de dois grupos), se amostras paramétricas/não paramétricas, respectivamente. Da mesma forma, possíveis correlações foram investigadas pelo teste de

Pearson/Spearman. Para estabelecer o ponto de corte de VKINA foi utilizada a análise da mediada do escore geral.

As curvas de sobrevivência foram geradas pelo método de estimativa de Kaplan-Meier e comparadas pelos testes de riscos proporcionais Log-rank (Mantel-Cox) ou Cox em análise univariada ou multivariada, respectivamente. Em todos os casos, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas usando o software Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

## **6 RESULTADOS**

Os resultados obtidos e a discussão serão apresentados de forma alternativa, como dois artigos científicos. Cada artigo está estruturado com base nas normas do periódico ao qual será submetido.

## Artigo 1

**Relação da versikina com o perfil linfocítico e agressividade em tumores mamários caninos**



## **Versikina e sua Associação com a Agressividade Tumoral e Resposta Imune nos tumores mamários de cães**

### **Resumo**

As interações ocorridas no microambiente tumoral desempenham um papel importante na etiopatogenia dos tumores mamários humanos e caninos. Os proteoglicanos e seus proteólitos, a exemplo da versikina (VKINA), podem atuar como marcadores prognósticos com influência na progressão tumoral. Frente à alta frequência dos tumores mamários caninos e por ser a cadela um modelo para o estudo comparativo e translacional do câncer de mama humano, objetivou-se avaliar a expressão da VKINA no microambiente tumoral e sua possível correlação com a resposta linfocítica e taxa de sobrevivência em cadelas com tumores mamários malignos. Um total de 65 cadelas foram selecionadas e divididas em quatro grupos: controle (GC: n=13), carcinomas em tumores mistos (CTM: n=33), carcinomas mamários (CM: n=12) e carcinosarcomas (CSS: n=7). As pacientes foram submetidas a avaliação clínica, laboratorial, mastectomia, caracterização clínico-patológica do tumor, morfologia do infiltrado inflamatório, imuno-histoquímica com marcação para VKINA, imunofenotipagem do sangue periférico e tumores por citometria de fluxo, além da análise de sobrevivência. Os resultados indicam que em tumores mamários malignos de cadelas há predomínio intratumoral de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em relação aos linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Os tumores que possuem maior infiltração de TCD8<sup>+</sup> apresentaram melhor prognóstico. A VKINA não pode ainda ser considerada um marcador prognóstico independente e a alta expressão de VKINA ( $\geq 120$ ) apresentou uma correlação direta com a graduação histológica e o TGF $\beta$ . Em conclusão, a alta expressão de VKINA ( $\geq 120$ ) pode interferir na agressividade tumoral, e estudo das suas interações devem ser considerados para a compreensão da sua capacidade imunomoduladora, sobretudo em diferentes tipos histológicos, a fim de trazer novas perspectivas prognósticas e terapêuticas, tanto para cadelas quanto para as mulheres.

**Palavras-chaves:** matriz extracelular, imunovigilância, linfócitos, câncer de mama, microambiente tumoral

### **Relation between versine and lymphocytic profile and aggressiveness in canine mammary tumors**

#### **Abstract**

Interactions occurring in the tumor microenvironment play an important role in the etiopathogenesis of human and canine mammary tumors. Proteoglycans and their proteolites, such as versikine (VKINA), can act as prognostic markers that influence tumor progression. Given the high frequency of canine mammary tumors and because the bitch is a model for comparative and translational studies of human breast cancer, the aim of this study was to evaluate the expression of VKINA in the tumor microenvironment and its possible correlation with the lymphocytic response and survival rate in female dogs with malignant mammary tumors. A total of 65 female dogs were selected and divided into four groups: control (CG: n=13), carcinomas in mixed tumors (CMT: n=33), mammary carcinomas (CM: n=12) and carcinosarcomas (CSS: n=7). The patients underwent clinical and laboratory evaluation, mastectomy, clinical-pathological characterization of the tumor, morphology of the inflammatory infiltrate, immunohistochemistry with VKINA staining, immunophenotyping of peripheral blood and tumors by flow cytometry, in addition to survival analysis. The results indicate that in malignant mammary tumors of dogs there is intratumoral predominance of TCD4<sup>+</sup> lymphocytes in relation to TCD8<sup>+</sup> lymphocytes. Tumors with higher expression of TCD8<sup>+</sup> had a better prognosis. VKINA cannot yet be considered an independent prognostic marker and high expression of VKINA ( $\geq 120$ ) showed a direct correlation

with histological grading and TGF $\beta$ . In conclusion, high expression of VKINA ( $\geq 120$ ) may interfere with tumor aggressiveness, and studies of its interactions should be relevant to understanding its immunomodulatory capacity, especially in different histological types, in order to bring new prognostic and therapeutic perspectives, for female dogs and women.

**Keywords:** extracellular matrix, immunosurveillance, lymphocytes, breast cancer, tumor microenvironment

## 1. Introdução

O câncer de mama apresenta alta frequência em cadelas, podendo chegar a 70% de todos os tipos neoplásicos nessa espécie (NUNES, 2018; PASTOR et al., 2018; ESTEVES et al., 2022). O tumor de mama ocorre espontaneamente na espécie canina e compartilha aspectos semelhantes na sua prevalência, etiologia, patogênese, classificação histopatológica, subtipos moleculares, heterogeneidade molecular e perfis de mutação com os tumores mamários em mulheres (GRAY et al., 2020; KWON et al., 2023; PINHO et al., 2012; SALAS et al., 2015; UVA et al., 2009). Desta forma, a cadela é considerada um modelo muito interessante para os estudos translacionais de câncer em seres humanos (GRAY et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2023; KWON et al., 2023).

O microambiente tumoral compreende às células do tumor, membrana basal, células endoteliais, adiposas, neuroendócrinas, fibroblastos, células imunes infiltrantes do tumor e a matriz extracelular (MEC), além uma infinidade de moléculas sinalizadoras como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento que regulam a progressão do tumor (NEOPHYTOU et al., 2021).

O entendimento do microambiente tumoral, seus componentes e interações tem sido fundamental para compreender melhor o comportamento da neoplasia. (GRETEN e GRIVENNIKOV, 2019; MAEKAWA et al., 2016). Resultados de pesquisas têm demonstrado que as interações ocorridas no microambiente tumoral desempenham um papel importante na etiopatogenia dos tumores mamários humanos e caninos (NEOPHYTOU et al., 2021; REIS et al., 2019) e o comportamento agressivo dessas neoplasias esteja relacionado ao processo inflamatório presente (BUJAK et al., 2020; CARVALHO et al., 2014; KIM et al., 2013).

Os linfócitos infiltrantes de tumor (TIL sigla em inglês *Tumor infiltrating lymphocytes*) representam um biomarcador prognóstico independente em mulheres (FENG et al., 2022; TOSS et al., 2018) e cadelas; (ESTRELA-LIMA et al., 2010), e esteve associado a menor sobrevida em cadelas com carcinomas inflamatórios mamários (DAMASCENO et al., 2022), assim a avaliação de TIL pode beneficiar pacientes com tumores de mama com potencial resposta às imunoterapias instituídas (VALENZA et al., 2023).

No microambiente tumoral, o Versican é um proteoglicano da matriz extracelular que no processo de remodelamento tecidual sofre a ação de enzimas proteolíticas, a exemplo das ADMTS e geram compostos bioativos denominados (matriquinas) dentre eles a versikina (VKINA) (NANDADASA et al., 2014). A VKINA é uma molécula, com ação pró apoptótica e indutora de expressão de citocinas em tumores hematogênicos (HOPE et al., 2016; McCULLOCH et al., 2009). Ambos, VCAN e VKINA, exercem um importante papel na inflamação tumoral, no remodelamento da matriz extracelular (DEB et al., 2022; PAPADAS et al., 2022) e podem influenciar na agressividade tumoral (CHENG et al., 2020).

Estudos mostram que a VKINA induz secreção de citocinas inflamatórias por macrófagos em mielomas humanos (HOPE et al., 2016), aumenta a infiltração de Linfócitos CD8<sup>+</sup> nos carcinomas colorretal (KRAUS et al., 2022), e estimula a infiltração de TCD8<sup>+</sup> anérgicos em mielomas (DHAKAL et al., 2019). Entretanto, em câncer de mama, pouco é sabido sobre o papel de VKINA e infiltrado de linfócitos no microambiente tumoral. Neste contexto, considerando que o modelo canino representa importantes perspectivas nos estudos translacionais em câncer de mama (FERREIRA et al., 2023; GRAY et al., 2020; KUPPUSAMY et al., 2023; KWON et al.,

2023; VALENZA et al., 2023), propõe-se avaliar a relação da VKINA com o perfil linfocítico e agressividade em tumores mamários malignos de cadelas.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Critérios de seleção, inclusão e exclusão.

Cadelas de diferentes raças, idades e portes, com tumor mamário atendidas pelo Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária da Universidade Federal da Bahia, Brasil, foram selecionadas entre 2022 e 2023. Destas, 52 cadelas de diferentes raças, idades e portes, aptas à realização da mastectomia unilateral foram incluídas no grupo experimental, em um ensaio clínico prospectivo e randomizado.

Foram considerados critérios de exclusão, a presença de outros tipos de tumores detectados durante o processo de seleção/estudo ou doenças concomitantes (infecciosas/auto-imunes); cadelas com neoplasia em ambas as cadeias mamárias, tumores mamários menores que 1,0 cm, e os casos em que as amostras do tumor colhido no momento da cirurgia não correspondia ao tumor de pior prognóstico.

Além das cadelas com tumor mamário, foram selecionadas 13 cadelas saudáveis para compor o grupo controle. As 65 cadelas avaliadas foram alocadas com base no diagnóstico histopatológico nos seguintes grupos: controle saudáveis (n=13 cadelas sem neoplasia mamária), grupo CTM (n=33 cadelas com Carcinomas em Tumores Mistos); grupo CM (n=12 cadelas com carcinomas mamários) e o grupo CSS (n=7 cadelas com carcinosarcomas).

A Comissão de Ética para o Uso de Animais Experimentais local (nº 16/2021) aprovou este protocolo de pesquisa, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os responsáveis pelos animais forneceram consentimento informado.

### 2.2 Avaliação Clínica e Mastectomia

Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica, cardiológica, radiografia torácica em três incidências, ultrassonografia de abdômen total para avaliação de metástase e exames de sangue incluindo hemograma completo e bioquímico (uréia e creatinina séricas). Após avaliação dos resultados dos exames, as cadelas aptas foram submetidas à exérese cirúrgica da cadeia mamária acometida e linfonodos regionais.

Os tumores malignos foram classificados de acordo com o sistema de estadiamento TNM (adaptado de OWEN, 1980), incluindo o tamanho do tumor (T), o envolvimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). Todas as pacientes foram submetidas à mastectomia total unilateral com retirada do linfonodo inguinal.

### 2.3 Classificação e graduação histológica

As lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) de cada caso foram confeccionadas em duplicata e revisadas por dois patologistas, de forma cega e independente, sem diagnóstico prévio. As classificações histopatológicas seguiram os critérios propostos por Cassali et al. (2020).

Os tumores foram classificados pelo Sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS, 1991), que avalia a porcentagem de formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Para avaliação da atividade mitótica, foram avaliados 10 campos neoplásicos, sem necrose ou artefatos, utilizando microscópio Olympus BX40, objetiva de 40×, número de campo ocular de 10×, campo de visão de 22 mm de diâmetro e 0,55 mm nos campos de nível de amostra. Todas as mitoses típicas e atípicas foram contadas em 10 campos (ou seja, 2,37 mm<sup>2</sup> de área).

As áreas de invasividade dos casos de CTMs foram utilizadas para classificá-las em grau I, II ou III (CASSALI et al., 2017). Quaisquer discrepâncias foram resolvidas utilizando-se um

microscópio multicabeças, com discussão para chegar a um consenso. Por fim, foram inseridos no estudo os casos com diagnóstico e graduação confirmados pelos dois avaliadores.

## 2.4 Análise morfológica do infiltrado tumoral

A análise dos aspectos morfológicos foi realizada em cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$  corados com HE e a reação inflamatória classificada pelo tipo inflamatório presente, distribuição e pela intensidade.

O tipo inflamatório foi classificado como: i) linfocítico; ii) histiocítico. A distribuição dos infiltrados inflamatórios foi avaliada e classificada em: i) focal: presença de 1 a 3 focos inflamatórios; ii) multifocal: presença de mais de 3 focos inflamatórios e iii) difuso: presença de células inflamatórias distribuídas uniformemente na secção tumoral. A intensidade da reação inflamatória foi categorizada em três subgrupos (discreta, moderada ou intensa) com base na análise morfológica do infiltrado inflamatório total. (ESTRELA-LIMA et al, 2010).

## 2.5 Imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo

### 2.5.1 Sangue periférico

Para determinar as frequências de leucócitos no sangue periférico, foram utilizadas 65 amostras, coletadas em EDTA (2 mL), adicionado em meio de cultura celular RPMI 1640, seguido de lise utilizando tampão de lise ACK (BD Biosciences CA) durante 10 minutos e lavado duas vezes com PBS 1x (Sigma, St. Louis, MO) a 300 xg. As células foram ajustadas a uma concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL em tubos de polipropileno para marcação com anticorpos monoclonais hospedado em ovelhas com reatividade contra antígenos caninos,  $\alpha$ -CD3-FITC (clone CA17.2A12),  $\alpha$ -CD4-RPE 1:320 (rato-IgG2a, clone YKIX302.9) e  $\alpha$ -CD8-AlexaFluor 647 1:40 (rato-IgG1, clone YCATE55.9), para determinação das subpopulações linfocítica; e IL12-PE 1:100; TGF $\beta$ -1-APC 1:100 para determinação das citocinas inflamatórias (Invitrogen, Elabsciesce, Bio-Rad Laboratories California, EUA)

### 2.5.2 Tumor mamário

Foram colhidos cinco fragmentos tumorais de 1cm<sup>3</sup> (n=52) representativos de áreas peri/intratumorais (DAMASCENO et al., 2022) para análise imunofenotípica por citometria de fluxo das pacientes dos grupos experimentais. Os fragmentos representavam as regiões cranial, caudal, medial, lateral e central do tumor em relação a cadeia mamária. Os fragmentos foram acondicionados em meio 5 mL de cultura celular RPMI 1640.

Os fragmentos dos tumores foram macerados mecanicamente seguido de filtração em Falcon de 50 $\mu\text{m}$  para purificação das células. Foi realizado a lavagem duas vezes com PBS 1X e quantificadas para  $1 \times 10^6$  células/mL colhidas em PBS até ao processo de marcação celular.

Para a marcação das células tumorais foram utilizados anticorpos monoclonais hospedados em ovinos com reatividade canina:  $\alpha$ -CD3-FITC (clone CA17.2A12),  $\alpha$ -CD4-RPE 1:320 (rato-IgG2a, clone YKIX302.9) e  $\alpha$ -CD8-AlexaFluor 647 1:40 (rato-IgG1, clone YCATE55.9); granzima B – Alexa Fluor 1:100 para determinação das subpopulações linfocítica (Bio-Rad Laboratories California, EUA); citocinas inflamatórias IL12-PE 1:100; TGF $\beta$ -1-APC 1:100; para determinação das citocinas inflamatórias CD14-APC 1:100 e Arginase-PE 1:100 para determinação de monócitos (Invitrogen, Elabscience, Bio-Rad Laboratories California, EUA).

Após todo o procedimento de marcação da fenotipagem tanto do sangue periférico e do tumor, as medidas citométricas de fluxo foram realizadas em um instrumento FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada primeiro controlando populações de linfócitos com base nas propriedades de dispersão direta (FSC) versus dispersão lateral (SSC). As características imunofenotípicas foram analisadas em gráficos de pontos

FL1/FITC de duas cores versus FL2/R-PE. A análise da citometria de fluxo foi realizada utilizando o pacote Cell Quest™ Software e o programa FlowJo 7.6.5

## 2.6 Expressão de VKINA

Para a realização da técnica de imuno histoquímica, secções dos de 4µm foram obtidas de cada caso (n=52) e coletadas sobre lâminas silanizadas (StarFrost). As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em uma série gradual de etanol e submetidas à tratamento enzimático por meio citrato-EDTA. 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 anti-DPEAAE, policlonal em diluição de 1:500, 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 (DAB) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Como controles positivos foram usadas amostras de tumor mamário previamente testado. A expressão de VKINA em áreas perivasculares foi considerada como controle interno positivo (ASANO et al., 2017). Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

A imunomarcagem de VKINA foi avaliada segundo Damasceno et al. (2012), por meio de escala semiquantitativa no estroma peritumoral adjacente, tanto *in situ* quanto em áreas invasivas de proliferação de células epiteliais malignas, considerando (i) a porcentagem total de tecido corado positivamente (0–100%) e (ii) a intensidade de coloração para o proteoglicano. De acordo com a escala, (1) foi considerado negativo ou pouco corado, (2) fraco, (3) moderado e (4) forte. O escore imuno-histoquímico da expressão foi calculado multiplicando-se a porcentagem de tecido corado (0–100%) pela intensidade da coloração (1–4).

## 2.7 Sobrevida

Todos os cães incluídos na análise da taxa de sobrevivência foram acompanhados incluindo avaliação clínica sistemática, exames radiológicos e análises bioquímicas e hematológicas. A taxa de sobrevida global, expressa em dias, foi definida como o tempo entre a excisão cirúrgica do tumor primário e a data do óbito ou término do experimento. Os cães que morreram durante o período de acompanhamento foram necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária para determinar a causa da morte e avaliar possíveis metástases.

## 2.8 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi realizado para verificar a significância das associações presuntivas entre variáveis. Os dados foram agrupados da seguinte forma: diagnóstico histológico (CM, CTM, CSS); tamanho do tumor (<5,0 ou ≥5 cm); metástase linfonodal (não ou sim); estadió clínico (I-II ou IV-V); grau histológico (I, II ou III); tipo de infiltrado inflamatório (linfocítico ou histiocítico), distribuição inflamatória (focal, multifocal ou difusa) e intensidade inflamatória (discreta, moderada ou intensa)

Inicialmente, foi aplicado o teste de Kolmogorov–Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Foram utilizados testes t de Student para as variáveis com distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para variáveis sem distribuição normal.

O teste de Spearman investigou possíveis correlações. Os coeficientes de correlação (r) foram interpretados segundo Pett e colaboradores (2003) dividindo as classificações em fraco (0–0,29),

baixo (0,3–0,49), moderado (0,5–0,69), forte (0,7–0,89) ou muito forte (0,9–1,0); sejam eles positivos ou negativos.

As curvas de sobrevivência foram geradas pelo método de estimativa de Kaplan-Meier e comparadas pelos testes de riscos proporcionais Log-rank Mantel-Cox ou Cox em análise univariada ou multivariada, respectivamente. Para estabelecer o ponto de corte da variável VKINA foi utilizada a mediana dos seus valores.

As análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos). Todas as análises foram realizadas utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para erro tipo I.

### 3. Resultados

#### 3.1 Características clínicas e patológicas

A idade das cadelas variou de quatro a 16 anos com média geral de  $10,7 \pm 2,9$ . Houve predominância de animais sem raça definida (SRD) independente dos grupos 36,5% (19/52). As cadelas com tumores acima de 5,0 cm representaram 55,7% (29/52) dos casos, com destaque para o grupo CSS, nos quais os tumores variavam de seis a 13,0 cm. No grupo de CM o subtipo histológico predominante foi carcinoma papilar grau II com 50,0% (06/12) e no grupo CTM a graduação I foi mais frequente 66,66% (22/33). Análise comparativa dos achados clínicos e patológicos CM, CTM e CSS são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Parâmetros clínico- patológicos das cadelas portadoras de neoplasia mamária.**

PARÂMETROS	CTM (n=33)	CM (n=12)	CSS (n=7)	p valor
<b>Média de idade<sup>1</sup></b>	10,33 ( $\pm 2,65$ ) <sup>a</sup>	9,58 ( $\pm 2,93$ ) <sup>b</sup>	14 ( $\pm 1,8$ ) <sup>ab</sup>	0,003*
<b>Tamanho do tumor<sup>2</sup></b>				
$\leq 5,0$ cm	19 (57,5%) <sup>a</sup>	8 (66,7%)	0 (0,0%) <sup>b</sup>	0,011*
$> 5,0$ cm	14 (42,5%)	4 (33,3%)	7 (100,0%)	
<b>Grau histológico<sup>2</sup></b>				
I	22 (66,7%) <sup>a</sup>	2 (16,7%) <sup>b</sup>	NA	0,010*
II	9 (27,2%)	9 (75,0%)	NA	
III	2 (6,06%)	1 (8,3%)	NA	
<b>Estadiamento Clínico<sup>2</sup></b>				
I-III	25 (75,7%) <sup>a</sup>	6 (50,0%)	3 (42,8%) <sup>b</sup>	0,029*
IV-V	8 (24,3%)	5 (41,7%)	2 (28,6%)	
NE	0 (0,0%)	1 (8,3%)	2 (28,6%)	
<b>Metástase Linfonodo<sup>2</sup></b>				
Presente	8 (24,3%)	5 (41,7%)	2 (28,6%)	0,029*
Ausente	25 (75,7%) <sup>a</sup>	6 (50,0%)	3 (42,8%) <sup>b</sup>	
NA	0 (0,0%)	1 (8,3%)	2 (28,6%)	

CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinossarcoma. NE: não estadiado. NA: não avaliado.

Testes estatísticos: Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn<sup>1</sup> e Qui-Quadrado<sup>2</sup>

Letras diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.2 Análise morfológica do infiltrado tumoral

A inflamação foi mais frequentemente moderada nos grupos CTM e CSS do que em CM, mas sem diferença entre os grupos e apresentou-se de maneira unânime com distribuição multifocal nos três grupos. Os linfócitos foram predominantes em todos os grupos experimentais (Tabela 2).

**Tabela 2. Análise morfológica do infiltrado tumoral**

MORFOLOGIA DO INFILTRADO TUMORAL		CTM (N=33)	CM (N=12)	CSS (N=07)	p-valor
<b>Tipo celular</b>	Linfocitário	8 (66,6%)	15 (45,5%)	4 (57,1%)	0,432
	Histiocítico	4 (33,3%)	18 (54,5%)	3 (42,9%)	
<b>Intensidade</b>	Leve	3 (25,0%)	8 (24,2%)	3 (42,9%)	0,592
	Moderado e intenso	9 (75,0%)	25 (75,8)	4 (57,1%)	

CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinosarcoma.

Teste estatístico: qui-quadrado.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

### 3.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do sangue periférico

Neste estudo, foi avaliado 65 amostras de sangue periférico (13 do GC, 33 do CTM, 12 do CM e 07 do CSS). As frequências e desvio padrão das populações de linfócitos no sangue periférico podem ser observados na tabela 3.

**Tabela 3. Perfil imune em sangue periférico.**

Linfócitos-Sangue Periférico (%)	GC (n=13)	CTM (n=33)	CM (n=12)	CSS (n=7)	p-valor
<b>Linfócitos Totais</b>	64,5 (±15,0) <sup>a</sup>	41,0 (±28,5) <sup>b</sup>	39,5 (±26,9)	37,4 (±19,9)	0,028*
<b>TCD3</b>	91,3 (±8,5) <sup>a</sup>	59,9 (±31,1) <sup>b</sup>	71,3 (±29,5)	46 (±33,5) <sup>c</sup>	0,002*
<b>TCD4</b>	53,4 (±24,5) <sup>A</sup>	46,3 (±25,4) <sup>A</sup>	54,7 (±24,5) <sup>A</sup>	44,5 (±29,2)	0,669
<b>TCD8</b>	30,8 (±14,1) <sup>B</sup>	25,9 (±19,0) <sup>B</sup>	22,8 (±18,3) <sup>B</sup>	38,3 (±26,0)	0,211
<b>CD4/CD8</b>	1,7	1,7	2,3	1,1	0,179
<b>CD4/IL12</b>	15,5 (±12,6) <sup>a</sup>	30,6 (±26,3)	40,9 (±25,5) <sup>b</sup>	28,8 (±27,2)	0,048*
<b>CD8/IL12</b>	20,6 (±18,4)	38,2 (±29,5)	50,4 (±33,3)	35,9 (±34,7)	0,127
<b>CD4/TGFB</b>	44,3 (±33,3)	39,6 (±32,8)	36,1 (±25,4)	26,3 (±34,9)	0,381
<b>CD8/TGFB</b>	47,2 (±31,0)	34,92 (±27,7)	21,08 ±16,6)	26,9 (±30,6)	0,135

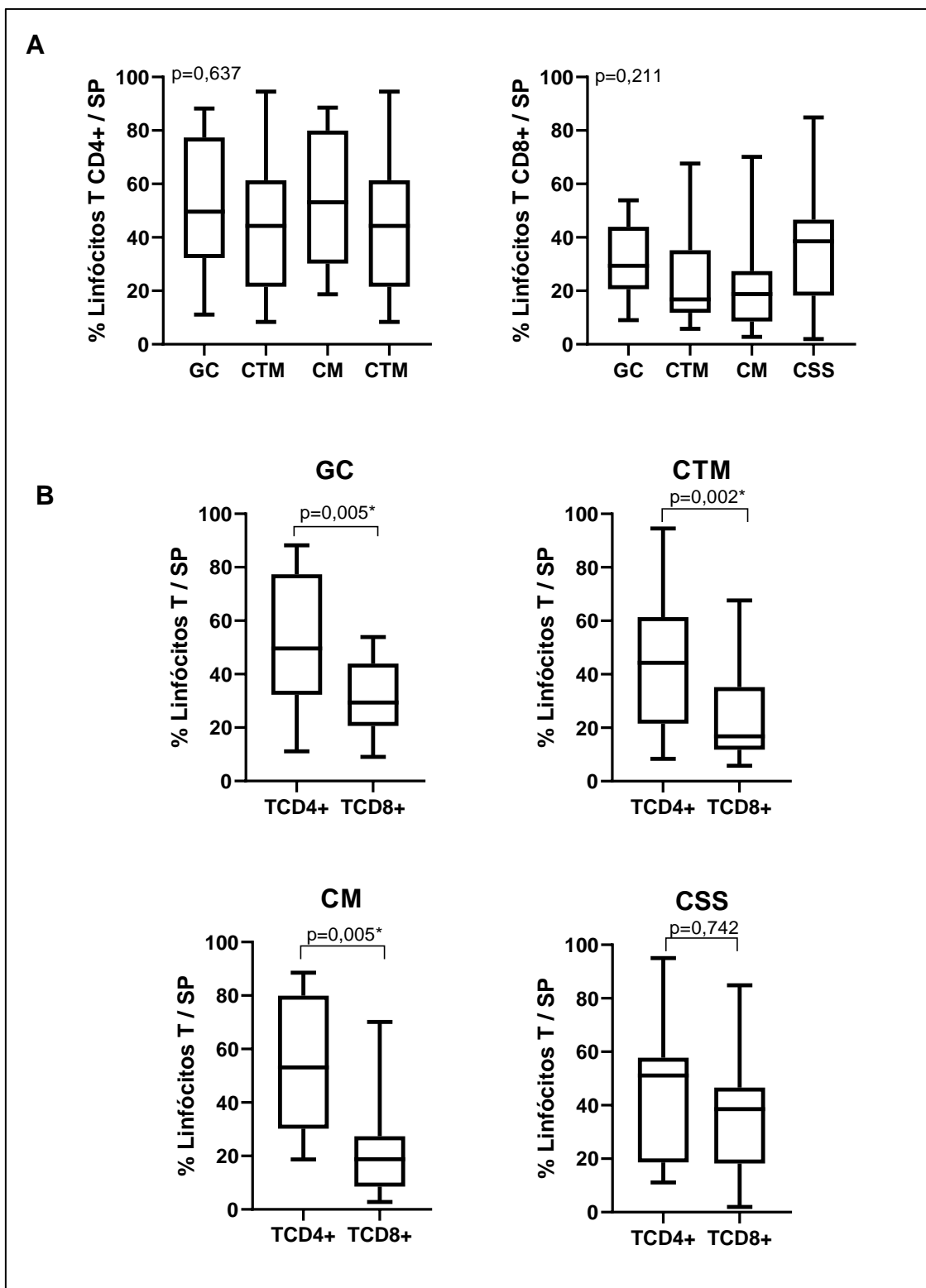
Testes estatísticos: Kruskal-Wallis/ Dunn e ANOVA/Tukey. (média±desvio padrão)

Letras minúsculas diferentes nas linhas demonstram diferenças estatísticas entre grupos

Letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferenças estatísticas dentro do grupo

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

Houve diferença entre a população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> do grupo GC (p=0,005), CTM (p=0,002) e CM (p=0,005) (Figura 1).



**Figura 1. Perfil imune no sangue periférico de cadelas portadoras de neoplasia mamária.**

A. Avaliação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos grupos experimentais. B. Comparações entre Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cada um dos grupos experimentais.

GC: Grupo Controle, CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinosarcoma. Testes estatísticos: ANOVA/Tukey e Dunn, Teste T pareado e Wilcoxon.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

### 3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do infiltrado tumoral

Foram avaliados 52 tumores (33 CTM, 12 CM e 07 CSS). As frequências e desvio padrão das populações de linfócitos no infiltrado tumoral podem ser observados na tabela 4.

**Tabela 4. Perfil imune no infiltrado tumoral**

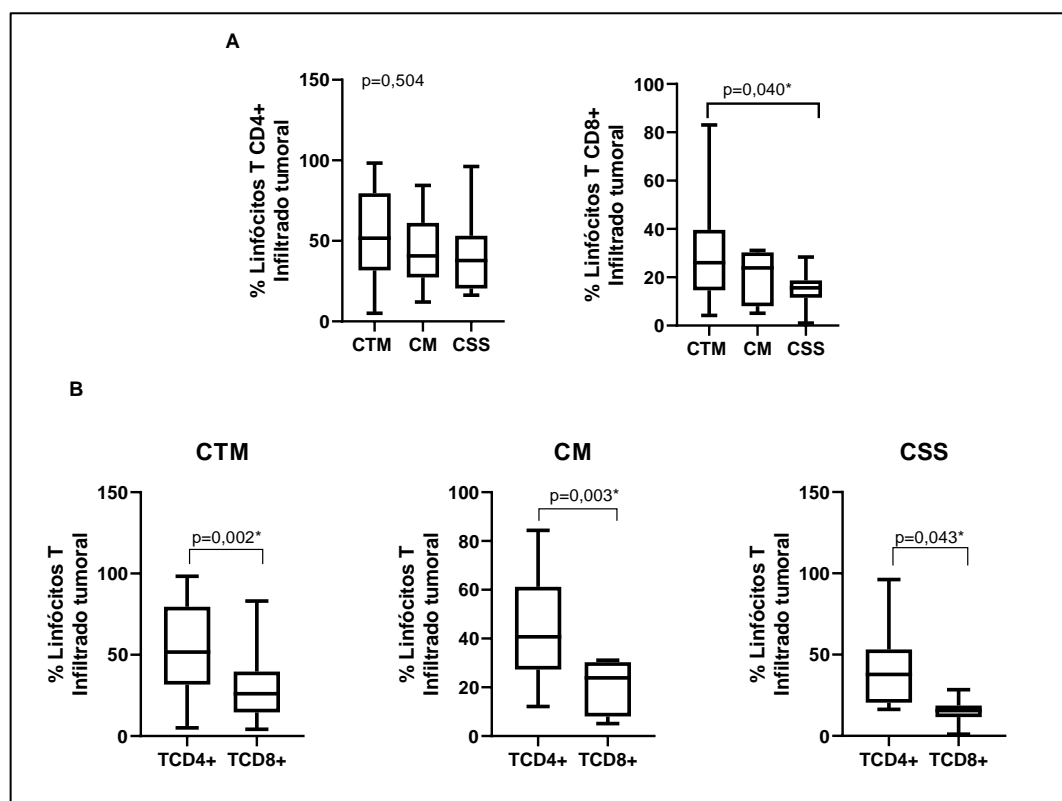
Linfócitos no Infiltrado Tumoral	CTM (n=33)	CM (n=12)	CSS (n=7)	p-valor
<b>Linfócitos Totais</b>	20,3 ( $\pm$ 14,3)	28,3 ( $\pm$ 13,0)	27,88 ( $\pm$ 16,6)	0,116
<b>TCD3<sup>+</sup></b>	74,7 ( $\pm$ 26,7)	76,0 ( $\pm$ 30,0)	49,3 ( $\pm$ 22,9)	0,062
<b>TCD4<sup>+</sup></b>	52,1 ( $\pm$ 26,8)	44,0 ( $\pm$ 20,7)	42,6 ( $\pm$ 27,3)	0,504
<b>TCD8<sup>+</sup></b>	30,3 ( $\pm$ 19,5) <sup>a</sup>	20,5 ( $\pm$ 10,3)	14,7 ( $\pm$ 8,3) <sup>b</sup>	0,040*
<b>CD4/CD8</b>	1,7	2,1	2,8	0,385
<b>CD4/IL12</b>	54,66 ( $\pm$ 33,5)	33,9 ( $\pm$ 26,5)	33,7 ( $\pm$ 28,5)	0,082
<b>CD4/TGFB</b>	31,9 ( $\pm$ 25,1)	44,7 ( $\pm$ 33,1)	21,2 ( $\pm$ 27,5)	0,123
<b>CD8/TGFB</b>	36,4 ( $\pm$ 31,4)	38,5 ( $\pm$ 30,1)	26,5 (17,6)	0,612
<b>CD8/GZB</b>	28,1 ( $\pm$ 25,6)	28,6 ( $\pm$ 29,6)	33,4 (30,3)	0,839
<b>CD14<sup>+</sup></b>	51,2 ( $\pm$ 30,7)	42,2 ( $\pm$ 36,4)	53,7 ( $\pm$ 31,2)	0,678
<b>CD14/ARG</b>	52,2 ( $\pm$ 29,5)	53 ( $\pm$ 34,1)	28,2 ( $\pm$ 20,9)	0,506
<b>CD14/PD1</b>	41,3 (34,5)	50,6 ( $\pm$ 33,0)	51,4 ( $\pm$ 26,8)	0,145

Testes estatísticos: Kruskal-Wallis/ Dunn e ANOVA/Tukey. (média $\pm$ desvio padrão)

Letras diferentes nas linhas demonstram diferença estatística entre grupos.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

Foram observadas diferenças entre as expressões de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, intratumorais em todos os grupos experimentais (Figura 2)



**Figura 2. Perfil imune do infiltrado tumoral de cadelas portadoras de neoplasia mamária.** A. Avaliação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos grupos experimentais. B. Comparações entre Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no infiltrado tumoral de cada um dos grupos experimentais.

CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinossarcoma.

Testes estatísticos: ANOVA/Tukey e Teste T pareado.

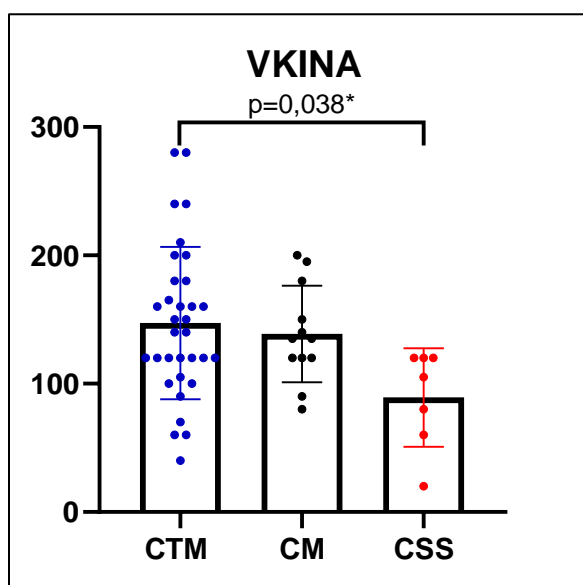
Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.5 Expressão de VKINA

Foram avaliados 52 tumores para a marcação de VKINA (12 do CM, 33 do CTM e 07 do CSS). O estroma intratumoral foi a área analisada e todos os casos foram positivos para a marcação de VKINA.

A intensidade predominante de marcação no grupo CM foi moderada, no grupo CTM com 11 casos para cada intensidade de marcação (leve, moderada, forte) e no grupo CSS os sete casos apresentaram marcação fraca. A mediana do escore de VKINA geral foi de 120, no grupo CM foi de 135, no grupo CTM foi 140 e no grupo CSS foi 105.

Houve diferença significativa quanto ao escore de VKINA entre os grupos CTM e CSS ( $p=0,038$ ) (Figura 3)



**Figura 3. Expressão de VKINA no estroma tumoral.**

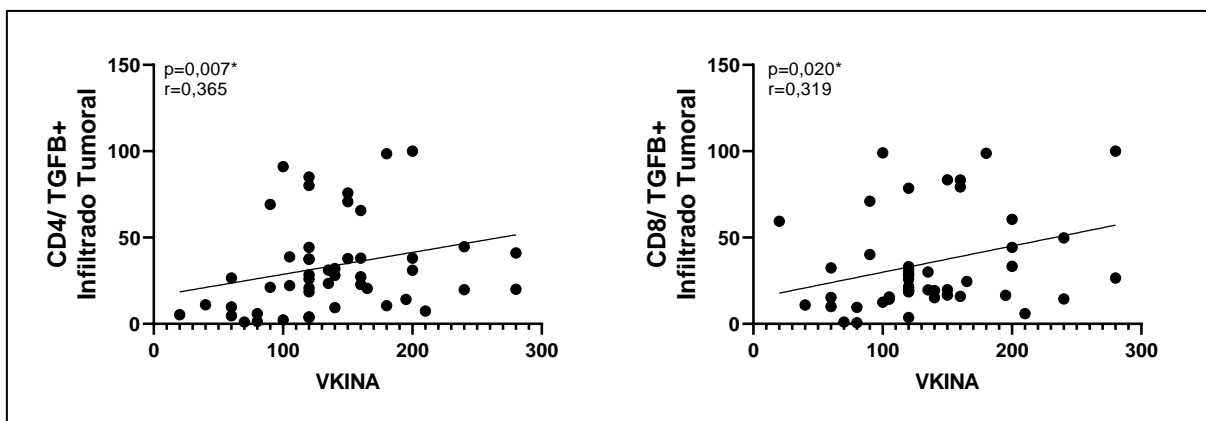
CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinossarcoma Testes estatísticos: ANOVA/Turkey. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

#### 3.5.1. Relação entre VKINA e os parâmetros clínico-patológicos e perfil linfocítico

No grupo CTM, foi observada a correlação entre VKINA e T CD3<sup>+</sup> intratumoral ( $p=0,03$ ,  $r=0,377$ ) e no grupo CSS, a VKINA apresentou correlação com linfócitos T CD4/IL12 ( $p=0,03$ ,  $r=0,852$ ) e T CD8/IL12 ( $p=0,01$ ,  $r=0,927$ ).

No grupo CM foi observado uma correlação negativa moderada entre VKINA e o infiltrado de linfócitos T CD8<sup>+</sup> intratumorais ( $p=0,03$ ,  $r=-0,642$ ) e positiva moderada entre VKINA e CD14<sup>+</sup> ( $p=0,04$ ,  $r=0,596$ ).

Sem distinção dos grupos, houve correlações positivas entre a expressão de VKINA e a expressão de TGFβ pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $p=0,007$ ,  $r=0,365$ ) e T CD8<sup>+</sup> ( $p=0,02$ ,  $r=0,319$ ) do infiltrado tumoral (Figura 4).



**Figura 4. Correlação entre o escore de VKINA com a expressão de TGFβ<sup>+</sup> intratumoral.**

Teste estatístico: Correlação de Spearman.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

Foi utilizado a mediana da expressão de VKINA ( $\geq 120$ ) como ponto de corte para a análise de correlação com tamanho, metástase nodal, estadiamento e grau histológico, e não houve associações com os parâmetros clínico-patológicos avaliados (Tabela 5).

**Tabela 5. Associação entre os parâmetros clínico-patológicos com base na mediana (120) da VKINA**

Parâmetros		VKINA <120	VKINA $\geq 120$	p valor
Diagnóstico histopatológico	CTM	08	25	0,224
	CM	07	14	
	CSS	04	03	
Tamanho	5,0 cm	07	18	0,781
	$\geq 5,0$ cm	12	24	
Metástase em linfonodo	Sim	06	12	0,748
	Não	09	26	
Estadiamento	I a III	09	26	0,748
	IV e V	06	12	
Grau histológico	I	07	19	>0,999
	II e III	08	20	

CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinosarcoma.

Testes estatísticos: exato de Fisher.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

A correlação da expressão de VKINA ( $\geq 120$ ) correlacionou-se com a graduação das neoplasias ( $p=0,006$ ), mas não houve correlação com o perfil imune intratumoral (Tabela 6)

**Tabela 6. Correlação entre a expressão imunoistoquímica de VKINA  $\geq 120$  com os parâmetros clínico independente dos grupos experimentais.**

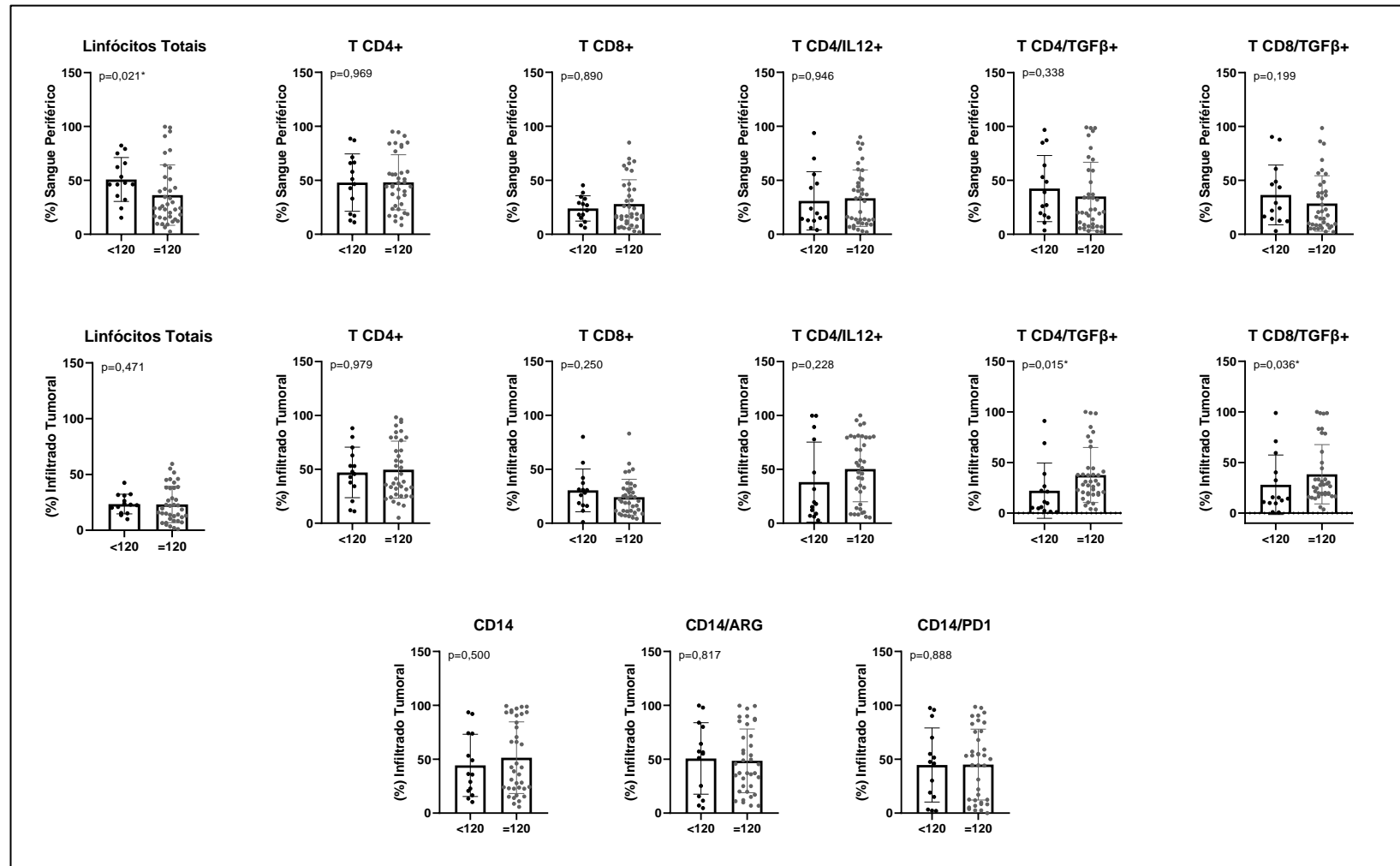
	VKINA ( $\geq 120$ )	<i>r</i>	p-valor
<b>Parâmetros clínicos-patológicos</b>	Tamanho tumoral	-0,167	0,314
	Estadiamento	-0,319	0,050
	Graduação	-0,455	0,006*
	Metástase em linfonodo	-0,317	0,062
<b>Perfil Linfocítico Intratumoral</b>	Linfócitos Totais	-0,070	0,672
	T CD4+	0,121	0,467
	T CD8+	-0,086	0,607
	CD4/IL12+	0,073	0,659
	CD8/IL12+	-0,173	0,298
	CD4/TGF $\beta$ +	0,134	0,421
	CD8/TFG $\beta$	0,185	0,265
	CD14	0,061	0,716
	CD14/ARG	0,097	0,566
	CD14/PD1	-0,046	0,786

CM: Carcinomas Mamário, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinossarcoma.

Teste estatístico: correlação de Spearman.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

Quando avaliado a diferença do perfil imune com base na expressão de VKINA ( $< 120$  ou  $\geq 120$ ) em relação a mediana do score de VKINA, observou-se diferenças sobretudo na expressão de TGF $\beta$ <sup>+</sup> pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> ( $p=0,015$ ) e T CD8<sup>+</sup> ( $p=0,036$ ) do infiltrado tumoral. Figura 5.



**Figura 5. Comparação do perfil imune de acordo com a mediana de VKINA.**

Testes estatísticos: teste T não pareado e Mann Whitney.

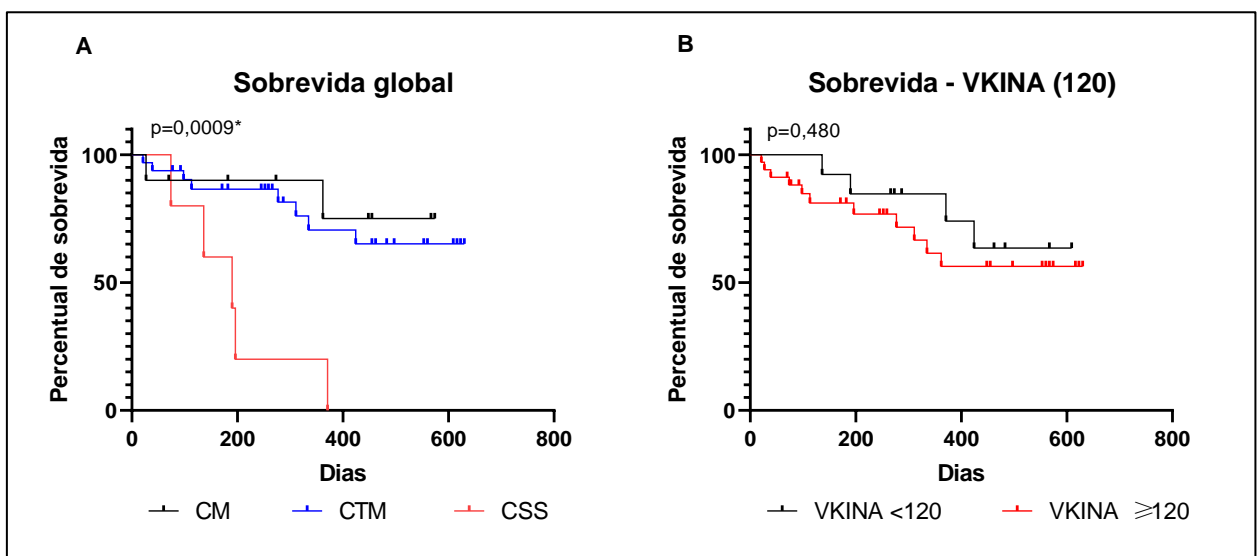
Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

### 3.6 Análise das curvas de sobrevivência

Foi possível obter a sobrevida global de 47 do total de 52 pacientes desse estudo. A sobrevida mínima foi de 21 dias atribuído a uma cadela do grupo CTM grau III, que evoluiu para óbito sem tempo hábil para realização de quimioterapia, e o período máximo de sobrevivência foi de 623 dias de uma cadela com diagnóstico de CTM grau I

A avaliação da taxa de sobrevida global foi realizada entre os grupos e apresentou diferença significativa ( $p=0,0009$ ), e constatação da menor sobrevida no grupo CSS em comparação com CM e CTM.

Houve diferença entre os grupos CM e CSS ( $p=0,006$ ,  $HR=0,147$  e  $IC=0,027-0,782$ ) e entre CTM e CSS ( $p=0,0006$ ,  $HR=0,178$  e  $IC=0,029-1,090$ ). Não houve diferença entre CM e CTM ( $p=0,652$ ,  $HR=0,702$  e  $IC=0,171-2,872$ ). Além disso, mediana de VKINA foi utilizado para análise de curva de sobrevida, sem diferença estatística ( $p=0,480$ ,  $HR=0,665$  e  $IC=0,230-1,919$ ) entre os pontos de corte ( $<120$  ou  $\geq 120$ ) (Figura 6).



**Figura 6. Taxas de sobrevida** A. Sobrevida global. B. Sobrevida com base no ponto de corte de VKINA (120). CM: Carcinomas Mamários, CTM: Carcinoma em Tumor Misto, CSS: Carcinossarcoma.

Teste estatístico: Kaplan-Meier, seguido do teste Log-rank.

Os valores de  $p$  foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.7 Análise univariada e multivariada

Apenas os linfócitos T CD8/TFG $\beta$  apresentaram associações com a sobrevida na análise univariada quando o escore de VKINA  $\geq 120$ , e na multivariada os linfócitos totais de Sangue periférico (Tabela 7)

**Tabela 7. Análise univariada e multivariada do perfil linfocítico e parâmetros clínicos quando o escore de VKINA  $\geq$  120 associados à sobrevida em cadelas portadoras de tumores mamários.**

Parâmetros		Univariada <sup>a</sup>		Multivariada <sup>b</sup>	
		IC 95%	p-valor	IC 95%	p-valor
<b>Clínico-patológicos</b>	Estadiamento	-0,2508 a 0,4371	0,552	-70,77 a 255,7	0,253
	Linfócitos Totais	-0,5438 a 0,1149	0,168	-5,48 a -0,244	0,033*
<b>Sangue Periférico</b>	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	-0,3587 a 0,3359	0,942	-4,249 a 3,829	0,915
	Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	-0,2221 a 0,4613	0,444	-3,464 a 3,356	0,974
	CD4/CD8	-0,4195 a 0,2709	0,635	-12,14 a 8,352	0,705
	Linfócitos Totais	-0,2668 a 0,4231	0,617	-4,182 a 5,866	0,732
<b>Infiltrado Tumoral</b>	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>	-0,4787 a 0,2008	0,374	-6,337 a 0,829	0,125
	Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>	-0,2947 a 0,3979	0,742	-0,478 a 11,08	0,070
	CD4/CD8	-0,5001 a 0,1737	0,295	-0,527 a 54,31	0,054
	CD4/TGFB	-0,3418 a 0,3528	0,972	-3,992 a 3,083	0,793
	CD8/TGFB	-0,6442 a -0,040	0,025*	-5,098 a 1,467	0,264

Legenda: a: Correlação de Spearman. b: Regressão linear múltipla;

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

#### 4 Discussão

A matriz extracelular (MEC) é um importante componente do microambiente tumoral. Compreender os mecanismos de sua desregulação ou remodelamento durante a progressão do câncer pode abrir novas perspectivas para terapias individualizadas (GRETEN e GRIVENNIKOV, 2019; POPOVA e JÜCKER, 2022). Entretanto, apesar de sua importância, o papel específico da degradação de proteoglicanos no câncer ainda é pouco compreendido (POPOV et al., 2023). Este estudo avaliou a expressão de VKINA e sua relação com a agressividade tumoral, o perfil inflamatório e a taxa de sobrevida em cadelas com tumores mamários malignos.

Os resultados desta pesquisa em relação aos parâmetros clínico-patológicos corroboram a literatura existente. Observou-se a idade média das pacientes (ESTRELA-LIMA et al., 2010; NUNES et al., 2018; MACHADO et al., 2018), a correlação entre o tamanho tumoral e o pior prognóstico (FERREIRA et al., 2009), e a alta frequência de carcinomas em tumores mistos (NUNES et al., 2018; PATEL et al., 2019).

A análise do tipo celular presente no infiltrado inflamatório das neoplasias mamárias pode influenciar de diversas formas a progressão ou regressão tumoral, bem como a resposta ao tratamento e as taxas de sobrevida (ESTRELA-LIMA et al., 2010; 2012; 2016; VIEIRA-FILHO et al., 2018; BUJAK et al., 2020; SFACTERIA et al., 2021; DAMASCENO et al., 2022). Tumores mamários malignos em cadelas são caracterizados por uma infiltração marcante de células mononucleares, especialmente linfócitos, no estroma e ao redor de vasos e células neoplásicas (KIM et al., 2012). A ausência de dados significativos na análise morfológica pode refletir a homogeneidade dos grupos, ou seja, por se tratar apenas de tumores malignos, no entanto, difere do observado por Sfacteria e colaboradores (2021), que relataram variação na quantidade de células inflamatórias associadas ao tumor a depender do grau de malignidade da neoplasia.

A maior frequência de infiltrado intratumoral histiocítico em subgrupos mais agressivos, como CM e CSS, sugere a ativação de macrófagos pela via alternativa, resultando em um microambiente imunossupressor (ESTRELA-LIMA et al., 2010; KIM et al., 2012; CHEN et al., 2022; VIEIRA-FILHO et al., 2018). Por isso, os estudos de fenotipagem das células inflamatórias e citocinas são fundamentais e mais robustos do que a morfologia para inferir sobre a interferência da inflamação nos carcinomas mamários de cadelas.

As proporções de subtipos específicos de linfócitos variam entre pacientes com câncer. Neste estudo, os níveis plasmáticos de linfócitos T CD3<sup>+</sup> foram menores em cadelas com neoplasias mamárias, especialmente nos grupos CTM e CSS, em comparação ao grupo controle (CHEN et al., 2023; LISIECKA et al., 2024). No entanto, o motivo pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido. Uma possibilidade é que o tumor secrete citocinas e fatores imunossupressores que resultem na queda da proteína CD3 (WATANABE et al., 2011). Esses dados sugerem que a análise da expressão do receptor CD3 pode ser útil para avaliação do prognóstico e progressão da doença em cadelas com tumores mamários malignos (LISIECKA et al., 2024)

Nossos dados demonstram que os linfócitos TCD8<sup>+</sup> circulantes são menores em relação aos TCD4<sup>+</sup> nos grupos CM e CTM, no entanto, sem correlações com parâmetros clínicos. Na literatura é observado que pacientes que expressam menos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, apresentam maior estadiamento clínico e presença de metástase nodal (CHEN et al., 2023) e em tumores mamário triplo negativos de mulheres a maior infiltração dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> em sangue periférico estavam relacionados a melhor sobrevida global e livre da doença e (LI et al., 2022). No entanto, em carcinomas em tumores mistos de cadelas observou-se maior frequência de Linfócitos TCD8<sup>+</sup> quando comparados a outros carcinomas mamários (ESTRELA-LIMA, et al., 2012).

Estrela-lima e colaboradores (2012) observaram ainda que a razão CD4/CD8 em sangue periférico de CTM pode ser um bom biomarcador prognóstico, no qual uma razão maior que 1,8 representa menor sobrevida das pacientes. Esses valores estão de acordo com o observado no presente estudo. No entanto, em tumores triplo negativos de mulheres, a maior razão representou uma melhor resposta terapêutica (LI et al., 2022), assim é importante a exploração dos subconjuntos de linfócitos periféricos em diferentes tumores mamários

A IL-12, a principal citocina pró inflamatória expressa por células apresentadoras de antígeno, células dendríticas, macrófagos ativadas e regulam a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em Th1 (HONG et al., 2013; HABANJAR et al., 2023). Esse dado pode ser corroborado ao observar a alta infiltração de CD4/IL12 pelo grupo CM e a diferença com o grupo controle, o que demonstra a ativação dessa citocina para o combate tumoral e melhor sobrevida em relação ao grupo CSS

As interleucinas desempenham um papel fundamental no câncer, com uma função particular no crescimento tumoral, invasão e potencial metastático como observado por Estrela Lima e colaboradores (2016) que relataram um o envolvimento da IL-10 no pior prognóstico em carcinomas mamários. (ESTRELA-LIMA et al., 2016)

Destaca-se que a avaliação de linfócitos em sangue periférico é uma abordagem menos invasiva, e na veterinária pode ser um caminho interessante de ser explorado e correlacionado com linfócitos infiltrantes do tumor, para abrir perspectivas de terapêutica e sobrevida nas pacientes.

A avaliação imunofenotípica do infiltrado tumoral já foi demonstrado em câncer de mama de mulheres que os tumores podem alterar ativamente a frequência dos subconjuntos de células T nos seus diferentes microambientes como sangue periférico, tecidos tumorais e nos linfonodos regionais, o que influencia na imunopatogênese desta doença (RAD et al., 2015). Em nosso estudo observou-se alta infiltração de T CD8<sup>+</sup> no grupo CTM em relação ao grupo CSS, corroborando o estudo de Estrela-Lima e colaboradores (2010), no qual as células TCD8<sup>+</sup> também atuaram como importantes biomarcadores prognósticos, e estavam associados à maior sobrevida a resposta imune antitumoral.

Também se notou que em todos os grupos houve predomínio significativo de TCD4<sup>+</sup> em relação a TCD8<sup>+</sup>, semelhante ao observado em tumores de mama malignos invasivo de mulheres (COPPOLA et al., 2022). Os TILs CD8<sup>+</sup>, representam um potencial fator prognóstico favorável e impactam as taxas de sobrevida livre da doença e global (SPATHAS et al., 2022).

Nesse estudo não foi observado associações da proporção CD4/CD8 com a sobrevida das pacientes, semelhante ao observado por (JORGENSEN et al., 2021), no entanto, a menor

proporção foi observada no grupo CTM, de melhor prognóstico. Esse achado corrobora o observado em modelo experimental, no qual animais submetidos a terapia, e que também apresentaram bom prognóstico obtiveram menor razão (ALAMSYAH et al., 2021)

As interações ocorridas entre as células tumorais, a modulação com o sistema imunológico e os componentes matriz extracelular são alvos de estudos recentes (GRETEN e GRIVENNIKOV, 2019; EBLE e NILAND, 2019; HARTMANN et al., 2014; MAEKAWA et al., 2016). A proteólise do VCAN (VKINA) está implicada em processos de crescimento tumoral e metástase (POPOVA e JÜCKER, 2022). Neste estudo, a presença de VKINA no estroma de todos os grupos experimentais sugere seu envolvimento na evolução tumoral, incluindo em carcinomas mamários caninos.

As diferenças na expressão de VKINA entre CTM e CSS podem estar relacionadas a atividades imunoreguladoras que estimulam citocinas inflamatórias e quimiotáticas, similar ao observado em mielomas (HOPE et al., 2016), além de promover a diferenciação de precursores de células dendríticas (HOPE et al., 2017). Estudos indicam que uma maior expressão de VKINA está associada a tumores de pior prognóstico, como no mieloma múltiplo humano (DHAKAL et al., 2019; HOPE et al., 2016).

Em cadelas com CTM e CSS, observou-se que a VKINA esteve relacionada invasividade de células neoplásicas, maior grau histológico e menor tempo de sobrevivência (SOUZA, 2021 - dados não publicados) contrastando nosso estudo, no qual, houve uma menor expressão de VKINA no grupo CSS. Contudo, é importante destacar que pouco se sabe a respeito da expressão de VKINA em neoplasia mamárias, além disso, a presente pesquisa apresenta um grupo amostral restrito de CSS, e ressalta-se a importância de avaliar o comportamento de desse proteólito em diferentes subtipos histológicos mamários

Nesse estudo a correlação da VKINA com parâmetro-clínicos importantes como grau histológico somente foi observada quando se utilizou um ponto de corte, baseado na mediana da expressão de VKINA e independente dos grupos histológicos. Não há até o momento descrições dessas correlações, apenas com o prognóstico do tumor (DHAKAL et al., 2019; HOPE et al., 2016),

Alguns autores acreditam que a VKINA pode contribuir para regulação do infiltrado inflamatório e resposta imune antitumoral (DHAKAL et al., 2019; HOPE et al., 2016; KRAUS et al., 2022). Hope e colaboradores (2016), ao estudarem o mieloma em humanos observaram que a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi predominante nos casos de alta expressão de VKINA, semelhante ao observado em câncer colorretal (HOPE et al., 2017; KRAUS et al., 2022) e em carcinomas humanos, incluindo os mamários em mulheres (EMMERICH et al., 2020) e em murinos (SANTOS, 2023). No entanto, esse dado não foi corroborado no presente estudo, tanto no perfil linfocítico de sangue periférico, quanto do infiltrado tumoral, o que pode demonstrar sua capacidade imunomoduladora, com atividades que dependem do contexto em que é apresentado às células, da fase inicial ou terminal da doença e versatilidade do precursor VCAN em se ligar a múltiplos receptores (WIGHT et al., 2020; REDONDO-GARCÍA et al., 2021).

Um achado importante demonstrado em nosso estudo refere-se a alta expressão de TGF- $\beta$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> intratumorais, quando a expressão de VKINA foi acima de 120, assim as correlações diretas entre essas moléculas. A interação entre a matriz extracelular e as células inflamatórias pode-se apresentar de maneira dinâmica a depender da fase e da intensidade do remodelamento ocorrido (PAPADAS et al., 2022). Na fase de progressão tumoral, a fibrose progressiva mediada por TGF- $\beta$  e acúmulo progressivo de VKINA resulta na paralisação das células efectoras e podem promover o escape imunológico (DEB et al., 2022; PAPADAS et al., 2022).

O TGF- $\beta$  é uma citocina reguladora pleiotrópica de numerosos processos fisiopatológicos, incluindo carcinogênese e respostas imunes (ZHAO et al., 2020; BULK et al.,

2021). Quando ainda em equilíbrio em ambientes tumorais o TGF- $\beta$  pode atuar como um gene supressor de tumor; inibindo a proliferação, regulando a diferenciação e, eventualmente, promovendo a apoptose (BULK et al., 2021). No entanto, as próprias células tumorais podem secretar TGF- $\beta$ , de forma a utilizar os seus efeitos inibitórios a outras células do microambiente tumoral, beneficiando-se, com um aumento do potencial invasivo e metastático avançando-se para um estado imunossupressor-(IHARA, et al., 2017; ZHAO et al., 2020; BULK et al., 2021).

Já foi demonstrado que a alta expressão de TGF- $\beta$ 1 foi capaz de estimular a super expressão de proteínas de ativação de fibroblastos, o que os induz a secretar mais VCAN, resultando em migração, invasão e transição epitélio-mesenquimal em câncer de bexiga. Entretanto, apesar de bastante interessante, a relação e os mecanismo envolvidos entre a VKINA e ao TGF- $\beta$ , são pouco esclarecidos na literatura (PING et al., 2023).

As células tumorais reconhecem via receptores os componentes da MEC e os modificam depositando ou degradando a matriz (ITOH, 2022; KARAMANOS et al., 2019) por isso estudos que demonstrem o remodelamento do estroma permite abordagem de imunoterapia mais personalizadas, além disso, na espécie canina, os estudos ainda são escassos e a interação entre VKINA e os subtipos linfocíticos, ou ainda, a VKINA como potencial biomarcador de resposta a imunoterapia, precisam ser melhor caracterizados em diferentes neoplasias mamárias caninas.

As pacientes dos grupos CM e CTM obtiveram maior taxa de sobrevida global quando comparadas ao grupo CSS, como esperado, visto que esse é o tumor de pior prognóstico (RAUBER et al., 2023). No que se refere a esse grupo, é possível mencionar o caráter mais agressivo dos subtipos tumorais mistos com proliferação sarcomatosas (CASSALI, 2017; DAMASCENO et al., 2016; NUNES et al., 2019; RASOTTO et al., 2017; RAUBER et al. 2023). Além disso, nesse subtipo houve predomínio de tumores grandes o que influencia diretamente no prognóstico (FERREIRA et al., 2009).

Em pacientes com mieloma múltiplo pós-transplantados que apresentaram menor sobrevida global e livre da doença com alta expressão de VKINA (DHAKAL et al., 2019), no entanto, esse achado não foi corroborado em nosso estudo, visto que a VKINA não demonstrou significância na curva de sobrevida. Contudo, no microambiente tumoral uma série de interações complexas entre as células tumorais, o sistema imunológico e a matriz extracelular ocorrem sem ainda haver uma elucidação completa de todos os mecanismos (LINDAHL et al., 2017; PIOTROWSKI et al., 2020).

Assim nossos dados demonstram que em tumores mamários malignos de cadelas há predomínio intratumoral de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em relação aos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, contudo, aqueles tumores que possuem maior infiltração de TCD8<sup>+</sup>, possuem melhor prognóstico. A VKINA não pode ainda ser considerada um marcador prognóstico independente, mas sua alta expressão ( $\geq 120$ ) apresentou uma correlação direta com a graduação histológica e TGF $\beta$  no microambiente tumoral. Futuras pesquisas podem elucidar ainda mais a influência da VKINA na agressividade tumoral e sua capacidade imunomoduladora, sobretudo em diferentes tipos histológicos, a fim de trazer novas perspectivas prognósticas e terapêuticas, não só para a espécie canina, mas dentro do contexto translacional, beneficiar também as mulheres.

### **Declaração de ética**

O estudo animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com número de protocolo 16/2021

### **Financiamento**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela Bolsa MPRP (Proc. 88887.596070/2020-00). AE-L (Proc. 310248/2021-3) é bolsista de

produtividade em pesquisa e desenvolvimento tecnológico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses

### **Agradecimentos**

Todos os autores agradecem gentilmente às principais instalações do Instituto Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz Fiocruz/ Bahia e Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

## **5 Referências**

ALAMSYAH, F.; PRATIWI, R.; FIRDAUSI, N.; IRENE MESAK PELLO, J.; EVI DWI NUGRAHENI, S.; GHITHA FADHLURRAHMAN, A.; NURHIDAYAT, L.; PURWO TARUNO, W. Cytotoxic T cells response with decreased CD4/CD8 ratio during mammary tumors inhibition in rats induced by non-contact electric fields. *F1000Research*, v. 10, p. 35, 19 jan. 2021.

ASANO, Y. *et al.* Prediction of treatment response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer by subtype using tumor-infiltrating lymphocytes. *Anticancer Research*, v. 38, n. 4, p. 2311–2321, 2018.

BUJAK, J. K.; SZOPA, I. M.; PINGWARA, R.; KRUCZYK, O.; KRZEMIŃSKA, N.; MUCHA, J.; MAJCHRZAK-KULIGOWSKA, K. The expression of selected factors related to t lymphocyte activity in canine mammary tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 7, 1 abr. 2020.

BULK, J. VAN DEN; MIRANDA, N. F. C. C. DE; DIJKE, P. TEN. Therapeutic targeting of TGF- $\beta$  in cancer: Hacking a master switch of immune suppression *Clinical Science* Portland Press Ltd, , 1 jan. 2021.

CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors *BioMed Research International*, 2014.

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

CHEN, X.; YANG, M.; YIN, J.; LI, P.; ZENG, S.; ZHENG, G.; HE, Z.; LIU, H.; WANG, Q.; ZHANG, F.; CHEN, D. Tumor-associated macrophages promote epithelial–mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/ $\beta$ -catenin signaling. *Cell Communication and Signaling*, v. 20, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2022.

CHENG, Y.; SUN, H.; WU, L.; WU, F.; TANG, W.; WANG, X.; LV, C. Vup-regulation of vcan promotes the proliferation, invasion and migration and serves as a biomarker in gastric cancer. *OncoTargets and Therapy*, v. 13, p. 8665–8675, 2020.

COPPOLA, L.; SMALDONE, G.; D’AIUTO, M.; D’AIUTO, G.; MOSSETTI, G.; RINALDO, M.; VERTICILLO, S.; NICOLAI, E.; SALVATORE, M.; MIRABELLI, P. Identification of Immune Cell Components in Breast Tissues by a Multiparametric Flow Cytometry Approach. *Cancers*, v. 14, n. 16, 1 ago. 2022.

DAMASCENO, K. A.; SANTOS-CONCEIÇÃO, A. M. DOS; SILVA, L. P.; SOUZA CARDOSO, T. M. DE; COSTA VIEIRA-FILHO, C. H. DA; SANTOS FIGUERÊDO, S. H.; MARTINS-FILHO, E.; OLIVEIRA DE FARIA, B. G.; COSTA-NETO, J. M. DA; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A. Factors related to the suppression of the antitumour immune response in female dogs with inflammatory mammary carcinoma. *PLoS ONE*, v. 17, n. 5 May, 1 maio 2022.

DEB, G.; CICALA, A.; PAPADAS, A.; ASIMAKOPOULOS, F. Matrix proteoglycans in tumor inflammation and immunity *American Journal of Physiology - Cell Physiology* American Physiological Society, , 1 set. 2022.

DHAKAL, B. *et al.* Versican proteolysis predicts immune effector infiltration and post-transplant survival in myeloma *Leukemia and Lymphoma* Taylor and Francis Ltd, , 24 ago. 2019.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis* 2019 36:3, v. 36, n. 3, p. 171–198, 11 abr. 2019.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*, v. 41, n. 3A, p. 151–2, discussion 152-3, 1991.

EMMERICH, P.; DEMING, D. A.; MATKOWSKYJ, K.; HALBERG, R. VCAN accumulation and proteolysis play critical roles in directing CD8 + TILs and response to ICIs in solid tumors. [s.l: s.n.].

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M. DA; RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; D'ASSIS, M. J. M. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 131, n. 3, p. 751–763, fev. 2012.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; SOARES, R. P.; RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; COSTA, A. T.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; CASSALI, G. D. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 14, n. 1, p. 88–100, 2016.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates *BMC Cancer*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/256>>

FENG, J.; YI, J.; ZOU XU, X.; LI, J.; XIONG, Z.; HUANG, X.; ZHONG, W.; HUANG, W.; YE, F.; WANG, X. Peripheral blood lymphocytes subtypes as new predictors for neoadjuvant therapy efficacy in breast cancer. *Cancer Medicine*, v. 11, n. 15, p. 2923–2933, 1 ago. 2022.

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A. C.; CAVALCANTI, M. F.; SCHMITT, F. C.; CASSALI, G. D. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign

and malignant canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 7, n. 4, p. 230–235, 2009.

FERREIRA, T.; GAMA, A.; SEIXAS, F.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; LOPES, C.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P. A. Mammary Glands of Women, Female Dogs and Female Rats: Similarities and Differences to Be Considered in Breast Cancer Research. *Veterinary Sciences*, v. 10, n. 6, p. 379, 30 maio 2023.

GRAY, M.; MEEHAN, J.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C.; KAY, C.; TURNBULL, A. K.; MORRISON, L. R.; PANG, L. Y.; ARGYLE, D. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* *Frontiers Media S.A.*, , 28 abr. 2020.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. *Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences* ImmunityCell Press, , 16 jul. 2019.

HABANJAR, O.; BINGULA, R.; DECOMBAT, C.; DIAB-ASSAF, M.; CALDEFIE-CHEZET, F.; DELORT, L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences* *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, , 1 fev. 2023.

HARTMANN, N.; GIESE, N. A.; GIESE, T.; POSCHKE, I.; OFFRINGA, R.; WERNER, J.; RYSCHICH, E. Prevailing role of contact guidance in intrastromal T-cell trapping in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 13, p. 3422–3433, 1 jul. 2014.

HONG, C. C. *et al.* Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 139, n. 2, p. 477–488, jun. 2013.

HOPE, C. *et al.* Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. *Blood*, v. 128, n. 5, p. 680–685, 4 ago. 2016.

\_\_\_\_\_. Versican-Derived Matrikines Regulate Batf3–Dendritic Cell Differentiation and Promote T Cell Infiltration in Colorectal Cancer. *The Journal of Immunology*, v. 199, n. 5, p. 1933–1941, 1 set. 2017.

IHARA, S.; HIRATA, Y.; KOIKE, K. TGF- $\beta$  in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *Journal of Gastroenterology* *Springer Tokyo*, , 1 jul. 2017.

ITOH, Y. Proteolytic modulation of tumor microenvironment signals during cancer progression. *Frontiers in Oncology* *Frontiers Media S.A.*, , 5 set. 2022.

JØRGENSEN, N.; HVIID, T. V. F.; NIELSEN, L. B.; SØNDERSTRUP, I. M. H.; ERIKSEN, J. O.; EJLERTSEN, B.; GERDES, A. M.; KRUSE, T. A.; THOMASSEN, M.; JENSEN, M. B.; LÆNKHOLM, A. V. Tumour-infiltrating CD4-, CD8- and FOXP3-positive immune cells as predictive markers of mortality in BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 125, n. 10, p. 1388–1398, 9 nov. 2021.

KARAMANOS, N. K. *Extracellular matrix: key structural and functional meshwork in health and disease* *FEBS Journal* *Blackwell Publishing Ltd*, , 2019.

KIM, J. H.; HUR, J. H.; LEE, S. M.; IM, K. S.; KIM, N. H.; SUR, J. H. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. *Veterinary Journal*, v. 193, n. 1, p. 222–227, jul. 2012.

- KIM, N. H.; LIM, H. Y.; IM, K. S.; KIM, J. H.; SUR, J. H. Identification of Triple-negative and Basal-like Canine Mammary Carcinomas using Four Basal Markers. *Journal of Comparative Pathology*, v. 148, n. 4, p. 298–306, 2013.
- KRAUS, S. G.; MATKOWSKYJ, K. A.; EMMERICH, P. B.; ZHANG, W.; CLIPSON, L.; PASCH, C. A.; DEMING, D. A. Abstract 3842: Versican proteolysis is a predictive biomarker of tumor infiltrating lymphocytes within primary and metastatic colorectal cancer tumors. *Cancer Research*, v. 82, n. 12\_Supplement, p. 3842–3842, 15 jun. 2022.
- KUPPUSAMY, K.; RAJAN CRP-, A.; ROSE VARGHESE CRP-, G.; RAJAN LATHA CRP-, N.; KRISHNAN CRP-, N.; PATRA CRP-, D.; WARRIER CRP-, A.; BHUSHAN CRP-, S.; DIVAKARAN NAIR, N.; SRINIVAS, P.; ARTICLE, R. Pathological and Molecular Analysis of Spontaneous Canine Mammary Carcinomas and its Prognostic implications. 2023.
- KWON, J. Y.; MOSKWA, N.; KANG, W.; FAN, T. M.; LEE, C. Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor *Journal of Breast Cancer* Korean Breast Cancer Society, , 1 fev. 2023.
- LI, M.; XU, J.; JIANG, C.; ZHANG, J.; SUN, T. Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood T-Cell Subsets in Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 15 fev. 2022.
- LINDAHL, U.; COUCHMAN, J.; KIMATA, K.; ESKO, J. D. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. *Essentials of Glycobiology*, 7 set. 2017.
- LISIECKA, U.; BRODZKI, P.; ŚMIECH, A.; MICHALAK, K.; WINIARCZYK, S.; ZYLIŃSKA, B.; ADASZEK, Ł. The diagnostic value of selected immune parameters in peripheral blood of dogs with malignant mammary tumours - a preliminary study. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, v. 68, n. 2, p. 271–278, 1 jun. 2024.
- MACHADO, M. C.; COSTA-NETO, J. M. DA; PORTELA, R. D.; D'ASSIS, M. J. M. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; BARROUIN-MELO, S. M.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; ESTRELA-LIMA, A. The effect of naltrexone as a carboplatin chemotherapy-associated drug on the immune response, quality of life and survival of dogs with mammary carcinoma. *PLoS ONE*, v. 13, n. 10, p. 1–16, 2018.
- MAEKAWA, N. *et al.* Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, 1 jun. 2016.
- MCCULLOCH, D. R.; NELSON, C. M.; DIXON, L. J.; SILVER, D. L.; WYLIE, J. D.; LINDNER, V.; SASAKI, T.; COOLEY, M. A.; ARGRAVES, W. S.; APTE, S. S. ADAMTS Metalloproteases Generate Active Versican Fragments that Regulate Interdigital Web Regression. *Developmental Cell*, v. 17, n. 5, p. 687–698, 17 nov. 2009.
- NANDADASA, S.; FOULCER, S.; APTE, S. S. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis *Matrix Biology* Elsevier, , 2014.
- NEOPHYTOU, C. M.; PANAGI, M.; STYLIANOPOULOS, T.; PAPAGEORGIS, P. cancers The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. 2021.
- NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival

in canines with mammary neoplasms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 1 nov. 2018.

NUNES, F. C.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B. DE; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Veterinary and Animal Science*, v. 7, 1 jun. 2019.

OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. World Health Organisation, p. 1–52, 1980.

PAPADAS, A. *et al.* Stromal remodeling regulates dendritic cell abundance and activity in the tumor microenvironment. *Cell Reports*, v. 40, n. 7, 16 ago. 2022.

PASTOR, N.; CABALLÉ, N. C.; SANTELLA, M.; EZQUERRA, L. J.; TARAZONA, R.; DURAN, E. Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *Austral J Vet Sci*, v. 50, p. 143–147, 2018.

PATEL, S.; MASO, C. J. Ossification in Metastases from Carcinoma of the Breast. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, v. 198, n. 12, p. 1309–1311, 1966.

PETT, M. A.; LACKEY, N. R.; SULLIVAN, J. J. Making Sense of Factor Analysis Evaluating. *Making Sense of Factor Analysis*, p. 167–206, 2011.

PING, Q. *et al.* TGF- $\beta$ 1 dominates stromal fibroblast-mediated EMT via the FAP/VCAN axis in bladder cancer cells. *Journal of Translational Medicine*, v. 21, n. 1, p. 1–19, 1 dez. 2023.

PINHO, S. S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C. A.; GÄRTNER, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Translational Research*, v. 159, n. 3, p. 165–172, 1 mar. 2012.

PIOTROWSKI, I.; KULCENTY, K.; SUCHORSKA, W. Interplay between inflammation and cancer. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* Urban and Partner, , 1 maio 2020.

POPOV, A.; KOZLOVSKAYA, E.; RUTCKOVA, T.; STYSHOVA, O.; VAKHRUSHEV, A.; KUPERA, E.; TEKUTYEVA, L. Antitumor Properties of Matrikines of Different Origins: Prospects and Problems of Their Application. *International Journal of Molecular Sciences* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jun. 2023.

POPOVA, N. V.; JÜCKER, M. The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer. *Cancers* MDPI, , 1 jan. 2022.

RAD, F. R.; AJDARY, S.; OMRANIPOUR, R.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; HASSAN, Z. M. Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer. *Iranian Biomedical Journal*, v. 19, n. 1, p. 35–44, 2015.

RASOTTO, R.; BERLATO, D.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ZAPPULLI, V. Prognostic Significance of Canine Mammary Tumor Histologic Subtypes: An Observational Cohort Study of 229 Cases. *Veterinary Pathology*, v. 54, n. 4, p. 571–578, 2017.

RAUBER, D.; GERARDI, D. G.; OLIVEIRA, L. O.; VIEIRA, L. C.; CAPRIOLI, R. A.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L.; NUNES, F. C.; RODRIGUES, A. C. B. Clinical presentation, histological findings, and prognosis in female dogs with mixed mammary neoplasms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 75, n. 2, p. 174–184, 2023.

REDONDO-GARCÍA, S.; PERIS-TORRES, C.; CARACUEL-PERAMOS, R.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. ADAMTS proteases and the tumor immune microenvironment: Lessons from substrates and pathologies *Matrix Biology Plus* Elsevier B.V., , 1 fev. 2021.

REIS, D. C. DOS *et al.* Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, v. 9, 3 jul. 2019.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5, p. e0127381, 18 maio 2015.

SANTOS, J. S. S. RELAÇÃO ENTRE AS VERSICANASES ADAMTS E MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES: ESTUDO EM MODELO DE CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1. Salvador - Bahia: [s.n.].

SFACTERIA, A.; NAPOLI, E.; RIFICI, C.; COMMISSO, D.; GIAMBRONE, G.; MAZZULLO, G.; MARINO, G. Immune cells and immunoglobulin expression in the mammary gland tumors of dog. *Animals*, v. 11, n. 5, 1 maio 2021.

SOUZA, M. C. S. POTENCIAL BIOMARCADOR DA PROTEÓLISE DE VERSICAN NO CÂNCER DE MAMA: UM ESTUDO EM MODELO CANINO. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ INSTITUTO GONÇALO MONIZ - MESTRADO. Salvador: [s.n.].

SPATHAS, N. *et al.* Association between CD8+ Tumor Infiltrating Lymphocytes and the Clinical Outcome of Patients with Operable Breast Cancer Treated with Adjuvant Dose-Dense Chemotherapy—A 10 Year Follow-Up Report of a Hellenic Cooperative Oncology Group Observational Study. *Cancers* 2022, Vol. 14, Page 5635, v. 14, n. 22, p. 5635, 16 nov. 2022.

TOSS, M. S.; MILIGY, I.; AL-KAWAZ, A.; ALSLEEM, M.; KHOUT, H.; RIDA, P. C.; ANEJA, R.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O.; RAKHA, E. A. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in ductal carcinoma in situ of the breast. *Modern Pathology*, v. 31, n. 8, p. 1226–1236, 1 ago. 2018.

UVA, P. *et al.* Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, v. 10, n. 1, p. 1–20, 27 mar. 2009.

VALENZA, C.; TAURELLI SALIMBENI, B.; SANTORO, C.; TRAPANI, D.; ANTONARELLI, G.; CURIGLIANO, G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment *Cancers* MDPI, , 1 fev. 2023.

VIEIRA-FILHO, C. H. C.; BARROUIN-MELO, S. M.; DAMASCENO, K. A.; ARAÚJO, M. S. S.; BORGES, N. F.; SILVA, F. L.; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A. Tumor-associated macrophage is correlated with survival and SOCS protein expression in canine mammary carcinoma. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 38, n. 10, p. 1972–1980, 2018.

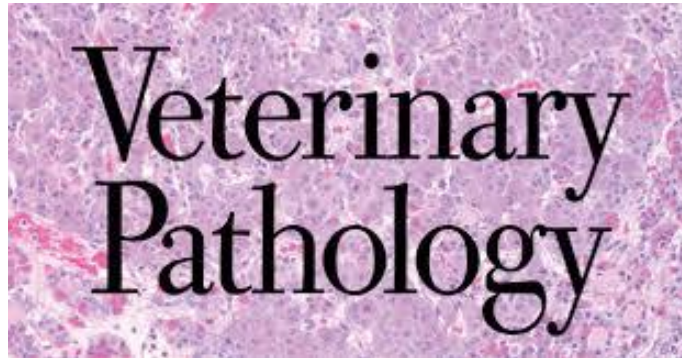
WATANABE, H. Versican and versikine: The dynamism of the extracellular matrix. *Proteoglycan Research*, v. 1, n. 4, 29 out. 2023.

WIGHT, T. N.; KANG, I.; EVANKO, S. P.; HARTEN, I. A.; CHANG, M. Y.; PEARCE, O. M. T.; ALLEN, C. E.; FREVERT, C. W. Versican—A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 24 mar. 2020.

ZHAO, H.; WEI, J.; SUN, J. Roles of TGF- $\beta$  signaling pathway in tumor microenvirionment and cancer therapy *International Immunopharmacology* Elsevier B.V., , 1 dez. 2020.

## Artigo 2

**Avaliação das diferenças do perfil Imune, matriz extracelular e matriquina: relação com a agressividade tumoral no Carcinomas em Tumores Mistos mamário caninos**



## Resumo

O carcinoma em tumor misto (CTM) de cadelas é uma neoplasia bastante frequente e heterogênea. É provável que interações ocorridas no microambiente tumoral possam desempenhar um papel importante na etiopatogenia desse subtipo histológico. Entretanto, estudo sobre os seus componentes mesenquimais/metaplásicos, o perfil imunológico e o remodelamento da matriz extracelular ainda são incipientes. Desta forma, objetivou-se avaliar as diferenças do perfil imune, matriz extracelular e a expressão de VKINA nos CTMs mamário de cadelas e sua relação com a agressividade tumoral. Um total de 46 cadelas foram selecionadas e divididas em três grupos: controle (GC: n=13), CTM grau I (CMT I: n=22), CTM grau II/III (CTM II/III: n=11). As pacientes foram submetidas a avaliação clínica, laboratorial, mastectomia, caracterização clínico-patológica do tumor, morfologia do infiltrado inflamatório intratumoral imunofenotipagem do sangue periférico e tumores por citometria de fluxo, avaliação de VKINA por imuno histoquímica, além da análise de sobrevida. Os resultados indicaram que o componente mesenquimal associado a matriz mixóide contribui para maior graduação, metástase nodal e menor sobrevida em CTM, a IL12 auxiliar o CTM I no combate tumoral, os tumores de maior agressividade (grau II/III), apresentaram maior infiltrado de TCD4<sup>+</sup> e TGF-β<sup>+</sup> e expressão de VKINA na matriz extracelular. Assim, sugere-se que o CTM tem um microambiente característico a depender do seu grau de agressividade. O componente mesenquimal, a alta expressão de TGF-β e VKINA influenciam na agressividade do tumor, enquanto a IL12 em CTM I auxilia no combate tumoral. Esse é o primeiro estudo a trazer a relação da VKINA com IL12 e TGF-β nesse subtipo histológico

**Palavras-chaves:** matriz extracelular, metaplasia, matriquinas, linfócitos, câncer de mama

**Assessment of differences in the immune profile, extracellular matrix and matrikine: relationship with tumor aggressiveness in canine mammary carcinomas in mixed tumors**

## Abstract

Carcinoma in mixed tumor (CMT) in female dogs is a very frequent and heterogeneous neoplasm, which may present several interactions in its tumor microenvironment, which may play an important role in the etiopathogenesis of this histological subtype. Although this type is quite frequent, studies on its mesenchymal/metaplastic components, immunological profile and remodeling of the extracellular matrix are still incipient. Thus, the objective of this study was to evaluate the differences in the immune profile, extracellular matrix and VKINA expression in mammary CMT of female dogs and their relationship with tumor aggressiveness. A total of 46 female dogs were selected and divided into three groups: control (GC: n=13), CMT grade I (CMT I: n=22), CMT grade II/III (CMTII/III: n=11). The patients underwent clinical and laboratory evaluation, mastectomy, clinical-pathological characterization of the tumor, morphology of the intratumoral inflammatory infiltrate, immunophenotyping of peripheral blood and tumors by flow cytometry, evaluation of VKINA by immunohistochemistry, in addition to survival analysis. The results indicated that the mesenchymal component associated with the myxoid matrix contributes to higher grading, nodal metastasis and lower survival in CMT, IL12 helps CMT I in tumor control, the most aggressive tumors (grade II/III) presented greater infiltration of TCD4<sup>+</sup> and TGFβ<sup>+</sup>, and expression of VKINA in the extracellular matrix. Thus, CMT has a characteristic microenvironment depending on its degree of aggressiveness. The mesenchymal component, the high expression of TGFβ<sup>+</sup> and VKINA influence tumor aggressiveness, while IL12 in MTC I helps in tumor control. This is the first study to show the relationship between VKINA and IL12 and TGF-β in this histological subtype.

**Keywords:** extracellular matrix, metaplasia, matrikines, lymphocytes, breast cancer

## 1. Introdução

A espécie canina é amplamente reconhecida como um modelo valioso para estudos comparativos e translacionais de câncer em seres humanos.<sup>33,34</sup> Isso se deve às notáveis semelhanças entre cães e humanos em termos de prevalência, etiologia, patogênese, classificação histopatológica, subtipos moleculares, heterogeneidade molecular e perfis de mutação.<sup>24,34</sup>

Os carcinomas em tumores mistos (CTM) são prevalentes entre as neoplasias mamárias malignas diagnosticadas em cadelas, chegando à 75% dos casos.<sup>49,53</sup> Histologicamente, os CTM são caracterizados por um componente epitelial maligno e um componente mesenquimal benigno que pode ser cartilagem, osso ou tecido adiposo<sup>7</sup> e geralmente o prognóstico para CTM é favorável.<sup>49</sup> Embora não equivalentes, carcinoma metaplásico da mulher também se caracterizam por uma mistura de componentes epiteliais e mesenquimais, no entanto, tendem a ser mais agressivo, com prognóstico desfavorável, maior tamanho tumoral, grau histológico elevado, fenótipo triplo-negativo, maior tendência à recorrência local e altas taxas de metástases.<sup>9,30</sup>

Ainda que se saiba que os padrões de proliferação epitelial no CTM possam interferir no prognóstico,<sup>58</sup> a influência dos componentes mesenquimais/metaplásicos e do microambiente tumoral na agressividade desse subtipo histológico ainda é pouco compreendida. O microambiente tumoral é composto pelas células tumorais, membrana basal, células endoteliais, adiposas, neuroendócrinas, fibroblastos, células imunes infiltrantes do tumor e a matriz extracelular (MEC), além de moléculas sinalizadoras como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento que regulam a progressão do tumor.<sup>47</sup> Pesquisas atuais buscam elucidar a contribuição da inflamação para a progressão tumoral, desenvolvimento de metástase e de imunoterapias específicas e individualizadas para os pacientes oncológicos.<sup>56</sup> Estudos de tumores mamários humanos e caninos sugerem que as interações ocorridas no microambiente estão relacionadas ao comportamento agressivo dessas neoplasias e processo inflamatório associado.<sup>3,5,31,47,60</sup>

Em mulheres com carcinomas mamários, os linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) demonstraram associações com a maior sobrevida e remissão completa<sup>21</sup>, agressividade tumoral e metástase em linfonodos<sup>67</sup>, tamanho tumoral, gradação e ausência de receptores de estrogênio, atuando como valor prognóstico independente.<sup>65,41,18</sup>

Em cadelas, a maior frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> esteve associada à ocorrência de metástase, enquanto a maior frequência dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> foi observada nos tumores de melhor prognóstico e sem metástases.<sup>17</sup> Já em carcinomas inflamatórios mamários foi observado que os linfócitos TCD8<sup>+</sup> indicaram aumento da malignidade assim como a menor sobrevida dessas cadelas.<sup>10</sup> Contudo, uma melhor avaliação e caracterização do perfil de TILs, inflamatórios, pode beneficiar pacientes com potencial resposta às imunoterapias instituídas.<sup>66</sup>

Além dos linfócitos, citocinas como a interleucina 12 (IL-12), recrutam células T citotóxicas *Natural Killers* (NK) e CD8<sup>+</sup>, além de colaborar com macrófagos M1 no combate a microorganismos e células tumorais.<sup>39,25</sup> Outra citocina reguladora importante é o fator de crescimento transformador –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que em homeostase em ambientes tumorais atua como um gene supressor de tumor. Contudo, com o desenvolvimento tumoral, o TGF- $\beta$  presente na matriz extracelular (MEC) pode apresentar efeitos contrários, resultando na progressão do tumor.<sup>73</sup>

A MEC promove interações dinâmicas entre seus elementos e os componentes inflamatórios. Dentre estes elementos, o versican é um proteoglicano da matriz extracelular

envolvido desenvolvimento embrionário, inflamação e processos metastáticos.<sup>70</sup> Ele pode ser clivado por enzimas proteolíticas, como as ADAMTS, gerando compostos bioativos denominados (matriquinas) entre eles a versikina (VKINA).<sup>46</sup> A VKINA possui importante papel na inflamação tumoral, no remodelamento da matriz extracelular,<sup>11,52</sup> promovendo apoptose e induzindo a expressão de IL-1b, IL-6, IL-12 por macrófagos em mielomas humanos.<sup>28</sup> Além disso, aumenta a infiltração de Linfócitos CD8<sup>+</sup> nos carcinomas colorretais<sup>32</sup>, e estimula a infiltração de TCD8<sup>+</sup> anérgicos em mielomas.<sup>12</sup>

Recentemente, pesquisadores tem se debruçado sobre a influência da VKINA na inflamação dentro do microambiente tumoral de carcinomas mamário, especialmente, na espécie canina.

Dessa forma, o modelo canino pode ser um recurso valioso na oncologia comparada, abrindo novas perspectivas para estudos de neoplasia mamárias em mulheres<sup>20,24,33,34,66</sup> Assim, propõe-se avaliar as diferenças do perfil imune, matriz extracelular e VKINA no Carcinoma em Tumor Misto mamário de cadelas e sua relação com a agressividade tumoral.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Critérios de seleção, inclusão e exclusão.**

Cadelas de diferentes raças, idades e portes, com tumor mamário atendidas pelo Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária da Universidade Federal da Bahia, Brasil, foram selecionadas entre 2021 e 2023. Do total de 165 cadelas atendidas, 33 cadelas de diferentes raças, idades e portes, aptas à realização da mastectomia unilateral foram incluídas no grupo experimental, em um ensaio clínico prospectivo e randomizado.

Foram considerados critérios de exclusão, a presença de outros tipos de tumores detectados durante o processo de seleção/estudo ou doenças concomitantes (infecciosas/auto-imunes); cadelas com neoplasia em ambas as cadeias mamárias, tumores mamários menores que 1,0 cm, e os casos em que as amostras do tumor colhido no momento da cirurgia não correspondia ao tumor de pior prognóstico.

Além das cadelas com tumor mamário, foram selecionadas 13 cadelas saudáveis para compor o grupo controle (GC), totalizando 46 cadelas. As 33 cadelas com diagnóstico de carcinoma em tumor misto (CMT) foram alocadas com base na graduação histológica, nos seguintes grupos: grupo CTM grau I (n=22) e grupo CTM grau II e III (n=11).

A Comissão de Ética para o Uso de Animais Experimentais local (nº 16/2021) aprovou este protocolo de pesquisa, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os responsáveis pelos animais forneceram consentimento livre e esclarecido.

### **2.2 Avaliação Clínica e Mastectomia**

Todos os animais foram submetidos a avaliação clínica, radiografia torácica em três incidências, ultrassonografia de abdômen total para avaliação de metástase e exames de sangue incluindo hemograma completo e bioquímico (uréia e creatinina séricas).

Os tumores malignos foram classificados de acordo com o sistema de estadiamento TNM (adaptado de OWEN, 1980), incluindo o tamanho do tumor (T), o envolvimento dos linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). Todas as pacientes foram submetidas à mastectomia total unilateral com retirada do linfonodo regional.

### **2.3 Classificação e graduação histológica**

Após a finalização do procedimento cirúrgico a cadeia mamária foi submetida ao exame histopatológico e as lâminas analisadas por 2 patologistas veterinários que seguiram os critérios propostos por Cassali et al. (2017)<sup>7</sup>. Os tumores foram classificados pelo Sistema de Nottingham<sup>13</sup>, que avalia a porcentagem de formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e índice

mitótico. Para avaliação da atividade mitótica, foram avaliados 10 campos neoplásicos, sem necrose ou artefatos, utilizando microscópio Olympus BX40, objetiva de 40×, número de campo ocular de 10×, campo de visão de 22 mm de diâmetro e 0,55 mm nos campos de nível de amostra. Todas as mitoses típicas e atípicas foram contadas em 10 campos (ou seja, 2,37 mm<sup>2</sup> de área).

#### **2.4 Análise do componente morfológico da matriz de CTM**

As lâminas histopatológicas coradas com hematoxilina e eosina de todos os animais selecionados foram avaliadas para obtenção de informações quanto ao tipo de matriz envolvida nos tumores avaliados, e foram em seguida categorizados como: i) CTM apenas com matriz mixóide, e ii) CTM com componente metaplásico, caracterizados por formação condróide, osteóide, mineralização, trabéculas ósseas maduras ou tecido mieloide.

#### **2.5 Análise morfológica do infiltrado tumoral**

A análise dos aspectos morfológicos foi realizada em cortes histológicos de 4 µm corados com HE e a reação inflamatória classificada pelo tipo inflamatório presente, distribuição e pela intensidade. O tipo inflamatório foi classificado como: i) linfocitário; ii) macrofágico. A distribuição dos infiltrados inflamatórios foi avaliada e classificada em: i) focal: presença de 1 a 3 focos inflamatórios; ii) multifocal: presença de mais de 3 focos inflamatórios e iii) difuso: presença de células inflamatórias distribuídas uniformemente na secção tumoral. A intensidade da reação inflamatória foi categorizada em três subgrupos (discreta, moderada ou intensa) com base na análise morfométrica do infiltrado inflamatório total.<sup>17</sup>

### **2.6 Imunofenotipagem de linfócitos por citometria de fluxo**

#### **2.6.1 Sangue periférico**

Para determinar as frequências de células inteiras no sangue periférico, foram utilizadas 46 amostras, coletadas em EDTA (2 mL), adicionado em meio de cultura celular RPMI 1640, seguido de lise utilizando tampão de lise ACK (BD Biosciences CA) durante 10 minutos e lavado duas vezes com PBS 1x (Sigma, St. Louis, MO) a 300 xg. As células foram ajustadas a uma concentração de 5 x 10<sup>5</sup> células/mL em tubos de polipropileno para marcação com anticorpos monoclonais hospedado em ovelhas com reatividade contra antígenos caninos, α-CD3-FITC (clone CA17.2A12), α-CD4-RPE 1:320 (rato-IgG2a, clone YKIX302.9) e α-CD8-AlexaFluor 647 1:40 (rato-IgG1, clone YCATE55.9), para determinação das subpopulações linfocítica; IL12-PE 1:100; TGFβ-1-APC 1:100 para determinação das citocinas inflamatórias (Invitrogen, Elabsciesce, Bio-Rad Laboratories California, EUA).

#### **2.6.2 Tumor mamário**

Foram colhidos de três a cinco fragmentos de 1cm<sup>3</sup>, tamanho dos nódulos mamários (n=33), de acordo com o para análise imunofenotípica por citometria de fluxo. Os fragmentos representavam as regiões cranial, caudal, medial, lateral e central do tumor em relação a cadeia mamária. Os fragmentos foram acondicionados em meio 5 mL de cultura celular RPMI 1640.

Os fragmentos dos tumores foram macerados mecanicamente seguido de filtração em Falcon de 50µm para purificação das células. Foi realizado a lavagem duas vezes com PBS 1X e quantificadas para 1 x 10<sup>6</sup> células/mL colhidas em PBS até ao processo de marcação celular. Para a marcação das células tumorais foram utilizados anticorpos monoclonais hospedados em ovinos com reatividade canina: α-CD3-FITC (clone CA17.2A12), α-CD4-RPE 1:320 (rato-IgG2a, clone YKIX302.9) e α-CD8-AlexaFluor 647 1:40 (rato-IgG1, clone YCATE55.9) e Granzima B – Alexa Fluor 1:100 para determinação das subpopulações linfocítica; IL12-PE 1:100; TGFβ-1-APC 1:100 para determinação das citocinas inflamatórias, Arginase-PE 1:100,

CD14-APC 1:100 para determinação de monócitos (Invitrogen, Elabsciesce, Bio-Rad Laboratories California, EUA)

Após todo o procedimento de marcação da fenotipagem tanto do sangue periférico e do tumor, as medidas citométricas de fluxo foram realizadas em um instrumento FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada primeiro controlando populações de linfócitos com base nas propriedades de dispersão direta (FSC) versus dispersão lateral (SSC). As características imunofenotípicas foram analisadas em gráficos de pontos FL1/FITC de duas cores versus FL2/R-PE. A análise da citometria de fluxo foi realizada utilizando o pacote Cell Quest™ Software e o programa FlowJo 7.6.5.

### 2.7 Expressão de VKINA

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, secções de 4µm foram obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas silanizadas (StarFrost). As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em uma série gradual de etanol e submetidas à tratamento enzimático por meio citrato-EDTA. 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 anti-DPEAAE, policlonal em diluição de 1:500, 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 (DAB) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Como controles positivos foram usadas amostras de tumor mamário previamente testado. A expressão de VKINA em áreas perivasculares foi considerada como controle interno positivo (ASANO et al., 2017). Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

A imunomarcação de VKINA foi avaliada segundo Damasceno et al. (2012), por meio de escala semiquantitativa no estroma peritumoral adjacente, tanto *in situ* quanto em áreas invasivas de proliferação de células epiteliais malignas, considerando (i) a porcentagem total de tecido corado positivamente (0–100%) e (ii) a intensidade de coloração para o proteoglicano. De acordo com a escala, (1) foi considerado negativo ou pouco corado, (2) fraco, (3) moderado e (4) forte. O escore imuno-histoquímico da expressão versicana foi calculado multiplicando-se a porcentagem de tecido corado (0–100%) pela intensidade da coloração (1–4).

### 2.8 Sobrevida

O tempo de sobrevida global foi definido como o período (em dias) entre a excisão cirúrgica do tumor primário e a data do óbito por qualquer motivo ou pela doença ou a data de conclusão do estudo. A sobrevivência global dos animais foi verificada por contato ao final do experimento. Os pacientes que evoluíram ao óbito durante o período de acompanhamento, com o consentimento dos responsáveis, foram encaminhados ao Laboratório de Patologia e necropsiados para determinação da causa da morte e identificação de possíveis metástases.

Os animais em que os tutores não seguiram em acompanhamento, ou que houve perda de contato, não foram incluídos na análise de sobrevida.

### 2.9 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi realizado para verificar a significância das associações presuntivas entre variáveis. Os dados foram agrupados da seguinte forma: Grupos (GC, CTM I, CTM II/III); tamanho do tumor (<5,0 ou ≥5 cm); metástase linfonodal (não ou sim); metástase

pulmonar (não ou sim); estadiamento clínico (I-III ou IV-V); grau histológico grau (I, II ou III); tipo de matriz (mixóide pura ou mixóide composta); tipo de infiltrado inflamatório (linfocitário ou histiocítico), distribuição inflamatória (focal, multifocal ou difusa) e intensidade inflamatória (discreta, moderada ou intensa)

Inicialmente, foi aplicado o teste de Kolmogorov–Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Foram utilizados testes t de Student para as variáveis com distribuição normal. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn foi utilizado para variáveis sem distribuição normal.

O teste de Spearman investigou possíveis correlações. Os coeficientes de correlação (r) foram interpretados segundo PETA e colaboradores (2003),<sup>55</sup> dividindo as classificações em fraco (0–0,29), baixo (0,3–0,49), moderado (0,5–0,69), forte (0,7–0,89) ou muito forte (0,9–1,0); sejam eles positivos ou negativos.

As curvas de sobrevivência foram geradas pelo método de estimativa de Kaplan-Meier e comparadas pelos testes de riscos proporcionais Log-rank Mantel-Cox ou Cox em análise univariada ou multivariada, respectivamente. As análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos). Todas as análises foram realizadas utilizando 0,05 como nível crítico de probabilidade para erro tipo I.

### 3. Resultados

#### 3.1 Características clínicas e patológicas

A idade das cadelas variou de quatro a 16 anos com média geral de 10,33±2,65. Houve predominância de animais sem raça definida (SRD) independente dos grupos 33,33% (11/33). No grupo CTM II/III apenas dois casos apresentaram graduação histológica III. A análise comparativa dos achados clínicos e patológicos são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1. Parâmetros clínico-patológicos das cadelas portadoras de neoplasia mamária.**

PARÂMETROS	CTM I (n=22)		CTM II/III (n=11)		p-valor	
	n	%	n	%		
<b>Média de Idade<sup>1</sup></b>	10,4 (±2,8)		10,18 (±2,3)		0,7833	
<b>Tamanho tumoral<sup>2</sup></b>	<5,0 cm	14	63,64	3	27,27	<0,0001*
	≥ 5,0 cm	8	36,36	8	72,73	
<b>Estadiamento Clínico<sup>2</sup></b>	I a III	18	81,82	4	36,36	<0,0001*
	IV e V	2	9,09	6	54,54	
	NE	2	9,09	1	9,09	
<b>Metástase Linfonodo<sup>2</sup></b>	Presente	2	9,09	6	54,55	<0,0001*
	Ausente	18	81,82	4	36,36	
	NA	2	9,09	1	9,09	

CTM: Carcinoma em Tumor Misto. NE: não estadiado. NA: não avaliado.

Testes estatísticos: Mann-Whitney<sup>1</sup> e Exato de Fisher<sup>2</sup>.

\*Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

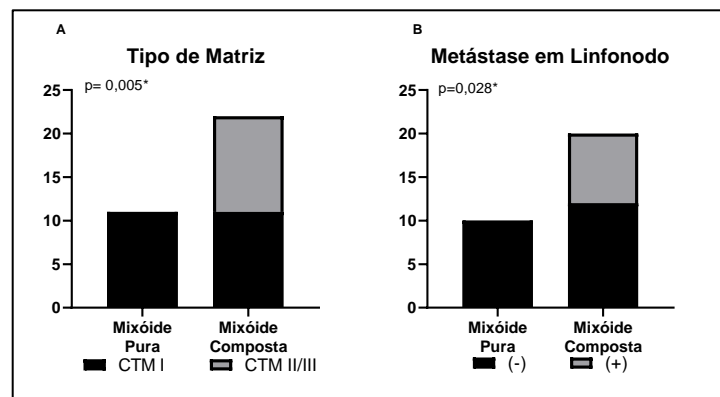
### 3.2 Análise do componente morfológico da matriz do CTM

No grupo CTM I houve proporções iguais (50%) de tumores com matriz mixóide pura e com componente associado, e no grupo CTM II todos os casos apresentaram componentes associados a matriz mixóide ( $p=0,005$ ) (tabela 2)

**Tabela 2. Avaliação do componente morfológico da matriz de CTM**

Matriz		CTM I	CTM II/III	p-valor
	Mixóide Pura	11	0	
Mixóide	Mixóide + condroide ou osteoide	5	7	0,005*
Composta	Mixóide + Tecido maduro	6	4	

Foi observado que oito tumores que apresentavam matriz mixóide composta desenvolveram metástase nodal, de forma que houve diferença entre o tipo de matriz envolvida e o acometimento metastático do linfonodo ( $p=0,028$ ). Destaca-se, que dentre esses 8 casos, 50% deles apresentavam matriz com tecido maduro caracterizado por cartilagem ou trabéculas ósseas. Além disso, todos os casos que apresentavam matriz mixóide pura não possuíam metástase para o linfonodo e eram do grupo CTM I (Figura 1).



**Figura 1. Análise da matriz intratumoral.** A. Tipo de matriz no grupos experimentais. B. Predomínio do tipo de matriz em relação a metástase para linfonodo.

Teste estatístico: Teste exato de Fischer

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.3 Análise morfológica do infiltrado tumoral

A inflamação foi mais frequentemente classificada como multifocal e moderada em ambos os grupos e apresentou-se de maneira unânime com distribuição multifocal nos dois grupos. O infiltrado inflamatório linfocitário foi predominante tanto nos CTM I, quanto no CTM II/III, sem diferença entre os grupos (Tabela 3).

**Tabela 3. Análise morfológica do infiltrado tumoral**

MORFOLOGIA DO INFILTRADO TUMORAL		CTM I (N=21)	CTM II/III (N=10)	p-valor
Tipo celular	Linfocitário	12 (59,0%)	7 (63,6%)	0,801
	Histiocitário	9 (41,0)	3 (36,4%)	
Intensidade	Leve	5 (22,7%)	2 (18,9%)	0,763
	Moderado + Intenso	13 (77,3%)	6 (81,8%)	

CTM: Carcinoma em Tumor Misto.

Teste estatístico: Qui-quadrado.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

### 3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do sangue periférico

Neste estudo, foi avaliado 46 amostras de sangue periférico (13 do GC, 22 do CTM I, e 11 do CTM II/III). As frequências e desvio padrão das populações de linfócitos no sangue periférico podem ser observadas na tabela 4

**Tabela 4. Perfil imune em sangue periférico**

Linfócitos em Sangue Periférico	GC (n=13)	CTM I (n=22)	CTM II/III (n=11)	p-valor
<b>Linfócitos Totais</b>	64,5 ( $\pm$ 15,0) <sup>a</sup>	40 ( $\pm$ 24,8) <sup>b</sup>	43,2 ( $\pm$ 36,1)	0,027*
<b>TCD3</b>	91,3 ( $\pm$ 8,5) <sup>a</sup>	61,1 ( $\pm$ 32,3) <sup>b</sup>	57,5 ( $\pm$ 29,8) <sup>c</sup>	0,004*
<b>TCD4</b>	53,4 ( $\pm$ 24,5) <sup>A</sup>	44,0 ( $\pm$ 23,5) <sup>A</sup>	51,0 ( $\pm$ 29,5)	0,533
<b>TCD8</b>	30,8 ( $\pm$ 14,1) <sup>B</sup>	26,19 ( $\pm$ 19,3) <sup>B</sup>	25,6 ( $\pm$ 19,2)	0,392
<b>CD4/CD8</b>	1,7	1,6	1,9	0,822
<b>CD4/IL12</b>	15,5 ( $\pm$ 12,6)	29,0 ( $\pm$ 26,3)	33,8 ( $\pm$ 27,2)	0,152
<b>CD4/TGFB</b>	44,3 ( $\pm$ 33,3)	40,9 ( $\pm$ 34,2)	36,8 ( $\pm$ 31,1)	0,334
<b>CD8/TGFB</b>	47,2 ( $\pm$ 31,0)	33,7 ( $\pm$ 26,6)	37,5 ( $\pm$ 31,2)	0,414

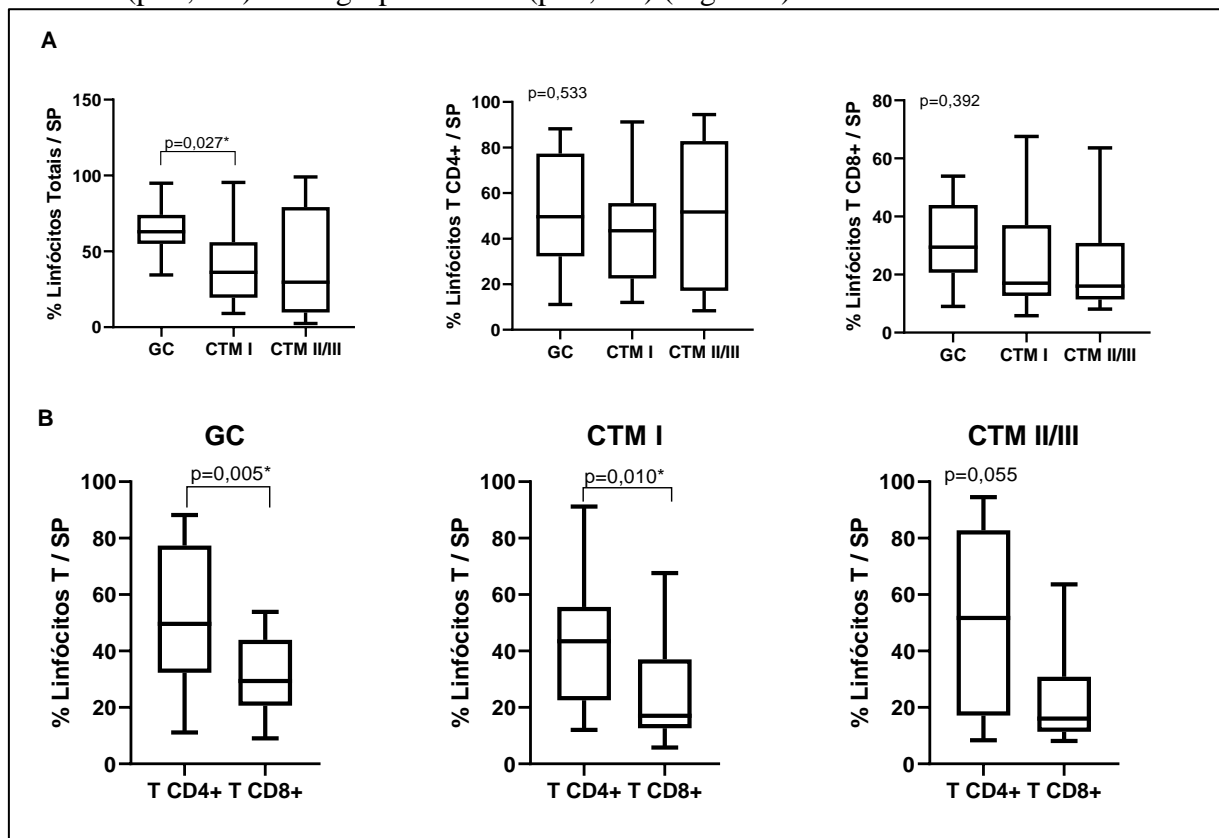
Testes estatísticos: Kruskal-Wallis/Dunn e ANOVA/Tukey

Letras minúsculas diferentes nas linhas demonstram diferenças estatísticas entre grupos

Letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferenças estatísticas dentro do grupo

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

Foi observada diferença entre a população de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no grupo Controle (p=0,005) e nos grupos CTM I (p=0,010) (Figura 2).



**Figura 2. Perfil imune no sangue periférico de cadelas portadoras de Carcinomas em Tumores Mistos. A.** Avaliação dos linfócitos Totais, TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> entre os grupos experimentais. **B.** Comparações entre Linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico de cada um dos grupos experimentais. CTM: Carcinoma em Tumor Misto. Testes estatísticos: ANOVA, teste T Pareado e Wilcoxon. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo do infiltrado tumoral

Foram avaliados 33 tumores (22 do CTM I e 11 do CTM II/III). As frequências e desvio padrão das populações de linfócitos no infiltrado tumoral podem ser observados na tabela 5.

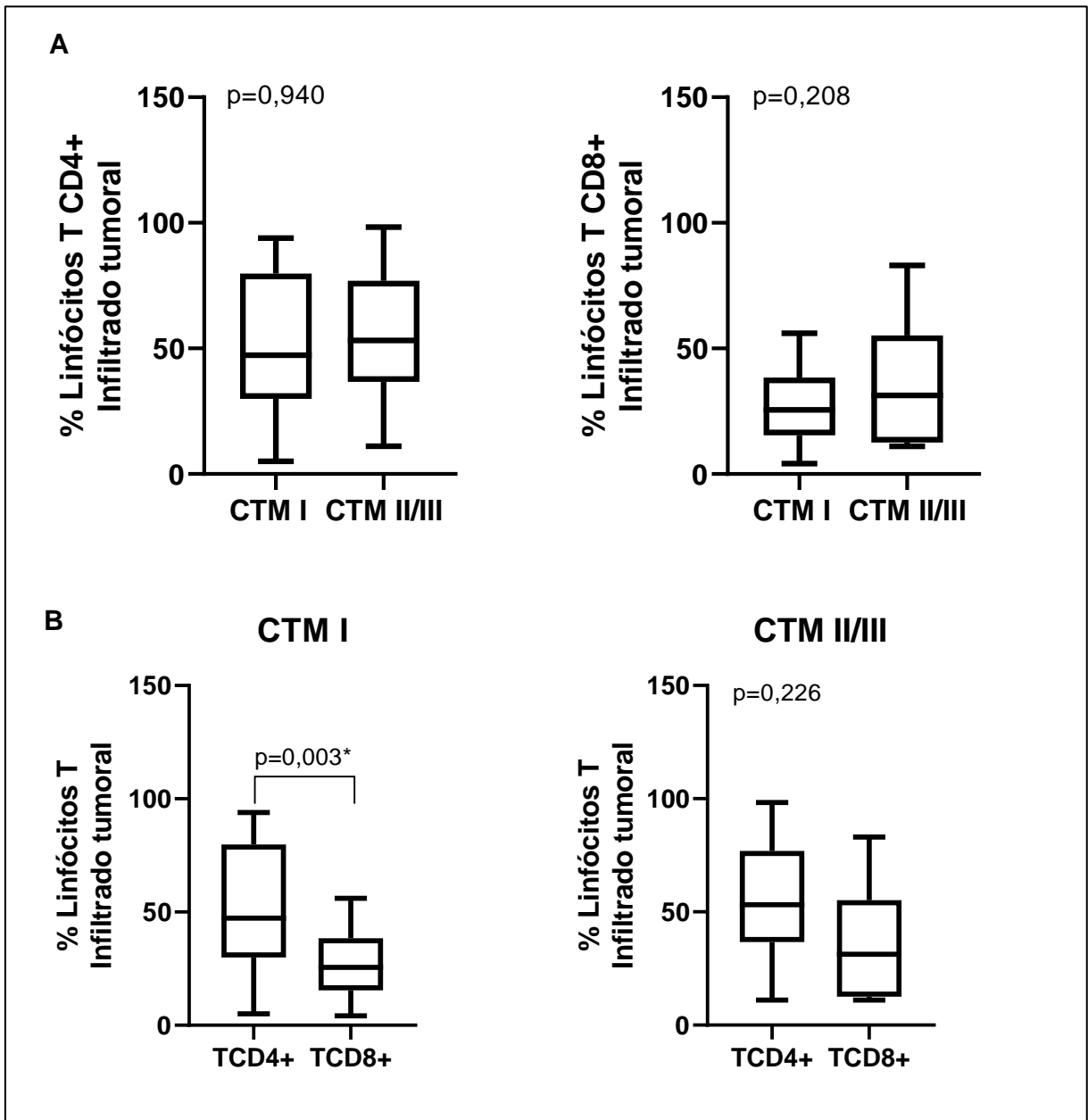
**Tabela 5. Perfil imune no infiltrado tumoral**

<b>Linfócitos no Infiltrado Tumoral</b>	<b>CTM I (n=22)</b>	<b>CTM II/III (n=11)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Linfócitos Totais</b>	21,3 (±16,5)	18,3 (±8,7)	0,800
<b>TCD3</b>	79,9 (±29,3)	76,2 (±19,8)	0,645
<b>TCD4</b>	51,9 (±27,3)	52,6 (±26,9)	0,940
<b>TCD8</b>	27,2 (±15,1)	36,4 (±26,0)	0,208
<b>CD4/CD8</b>	1,9	1,4	0,985
<b>CD4/IL12</b>	57,4 (±36,9)	49,3 (±26,0)	0,467
<b>CD4/TGFB</b>	24,7 (±16,4)	46,4 (±33,2)	0,017*
<b>CD8/IL12</b>	50,7 (±38,8)	51,1 (±32,3)	0,962
<b>CD8/TGFB</b>	38,4 (±33,2)	32,5 (±28,6)	0,778
<b>CD4/GZB</b>	22,3 (±21,9)	21,9 (±27,9)	0,511
<b>CD8/GZB</b>	26,5 (±25,6)	32,0 (±26,3)	0,537
<b>CD14</b>	51,4 (±29,4)	50,8 (±35,2)	0,957
<b>CD14/ARG</b>	56,1 (±28,4)	44,7 (±31,4)	0,303
<b>CD14/PD1</b>	40,7 (±36,5)	42,6 (±31,8)	0,961

Testes estatísticos: Mann-Whitney e Teste T não pareado

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

Houve diferença entre a população de linfócitos TCD4+ e TCD8+ do grupo CTM I ( $p=0,003$ ) (Figura 3).



**Figura 3. Perfil imune no infiltrado tumoral de cadelas portadoras de Carcinomas em Tumores Mistos. A.** Avaliação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos grupos experimentais. **B.** Comparações entre Linfócitos TCD4+ e TCD8+ no infiltrado tumoral de cada um dos grupos experimentais.

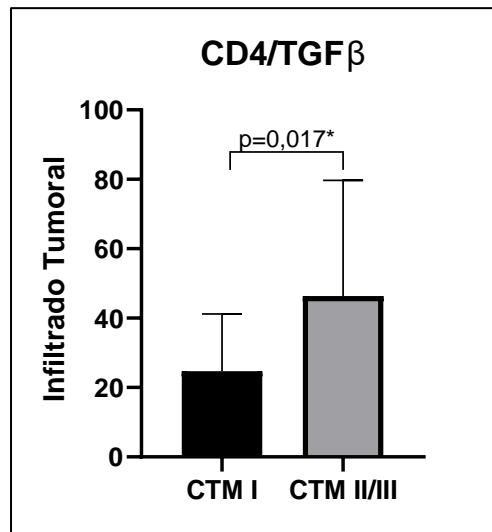
Testes estatísticos: teste T Pareado e Mann Whitney.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

Não houve diferença significativa na infiltração de CD4/IL12 entre os grupos. No entanto, ao investigar a relação entre a expressão de IL12 e a ativação de monócitos, foram encontradas correlações positivas entre CD4/IL12+ e CD14 no grupo CTM I ( $p=0,004$ ,  $r=0,600$ ).

A expressão de TGF- $\beta$  foi analisada no infiltrado tumoral, revelando uma diferença significativa entre os grupos ( $p=0,017$ ) (Figura 4). Para explorar as interações potenciais entre

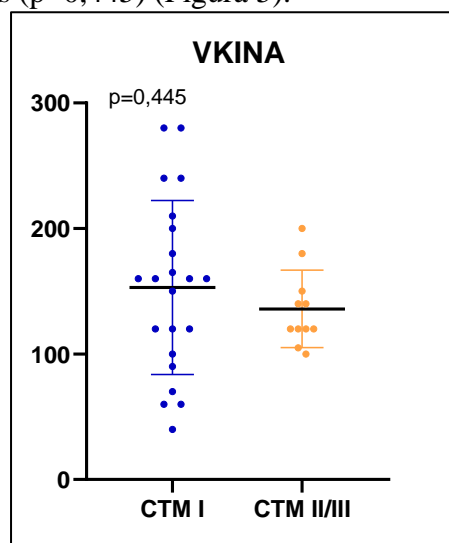
TGF- $\beta$  e a supressão da imunidade tumoral, foram avaliadas as correlações com Arginase e Granzima B. Não foram observadas correlações significativas entre CD4/TGF- $\beta$  e CD8/GZB+, nem entre CD4/TGF- $\beta$  e CD4/ARG+ nos grupos analisados.



**Figura 4. Expressão de CD4/TGF $\beta$ +. A.** Diferença entre a expressão de CD4/TGF- $\beta$  infiltrado tumoral dos grupos CTM I e CTM II/III. Teste estatístico: Kruskal Wallis e Mann-Whitne. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.6 Expressão de VKINA

Foram avaliados 33 casos de carcinoma em tumor misto (CTM) para a marcação de VKINA, sendo 22 do grupo CTM I e 11 do grupo CTM II/III. O estroma tumoral representou a área analisada, e todos os casos apresentaram positividade para VKINA. A intensidade predominante de marcação foi moderada no grupo CTM I e leve no grupo CTM II/III. A mediana do escore geral de VKINA foi de 140, com o grupo CTM I apresentando uma mediana de 160 e o grupo CTM II/III de 120. Não houve diferença significativa nos escores de VKINA entre os grupos ( $p=0,445$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Expressão de VKINA no estroma tumoral.**

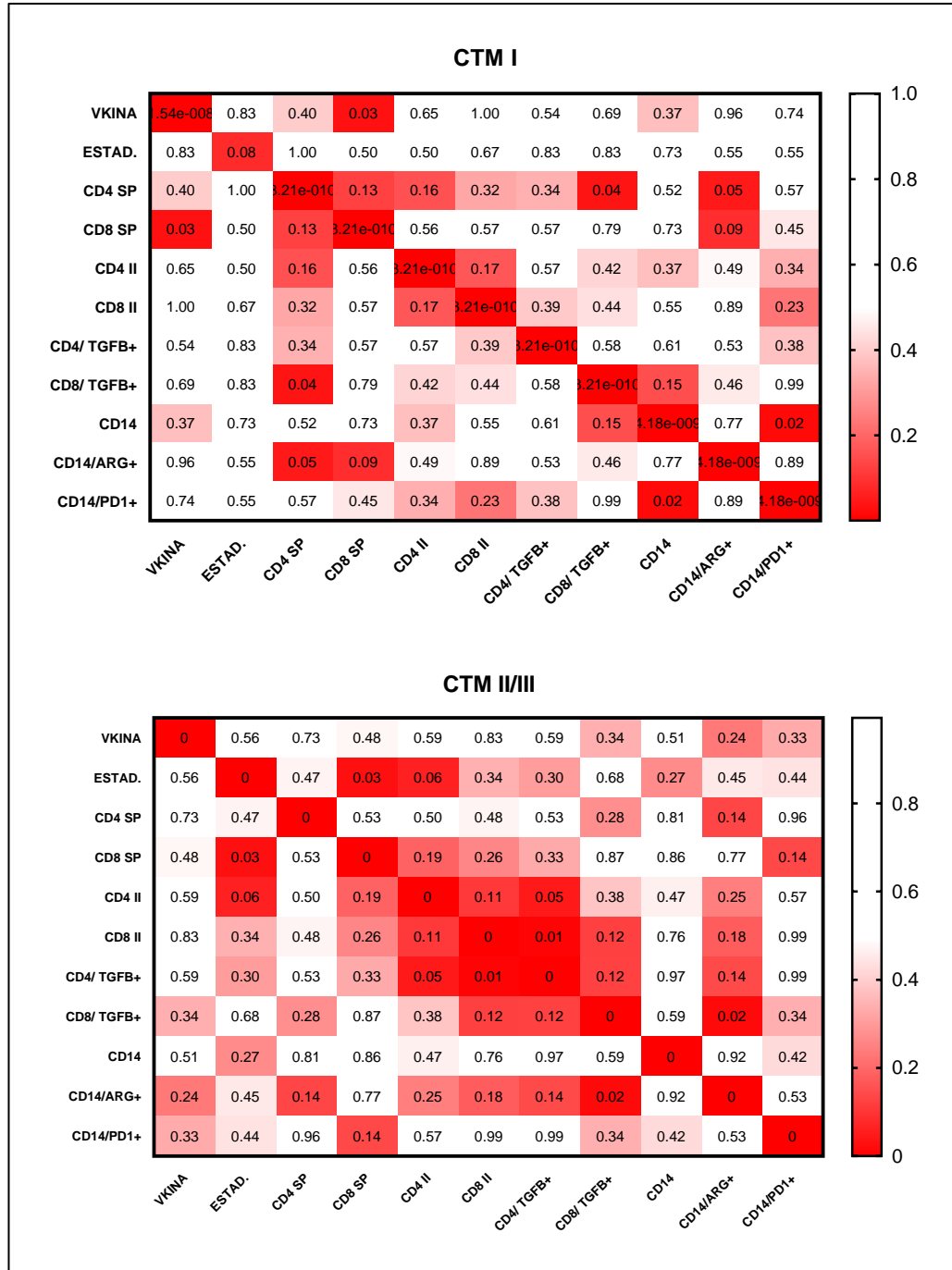
CTM: Carcinoma em Tumor Misto.

Teste estatístico: Teste T não pareado.

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05

**3.6.1 Relação entre VKINA e os parâmetros clínico-patológicos e perfil linfocítico.**

Houve correlação positiva do escore de VKINA com os linfócitos T CD8+ do sangue periférico do grupo CTM I ( $p=0,03$ ,  $r=0,603$ ). Não houve correlações entre o escore de VKINA (mediana=140) e os estadiamento das pacientes, (figura 6).



**Figura 6. Correlação entre a expressão imunoistoquímica de VKINA ( $\geq 140$ ), e os parâmetros clínico-patológicos e subpopulações linfocíticas no sangue periférico e no infiltrado tumoral entre os grupos.**

CTM: Carcinoma em Tumor Misto. SP: Sangue Periférico. II. Infiltrado tumoral

Testes estatísticos: correlação de Spearman.

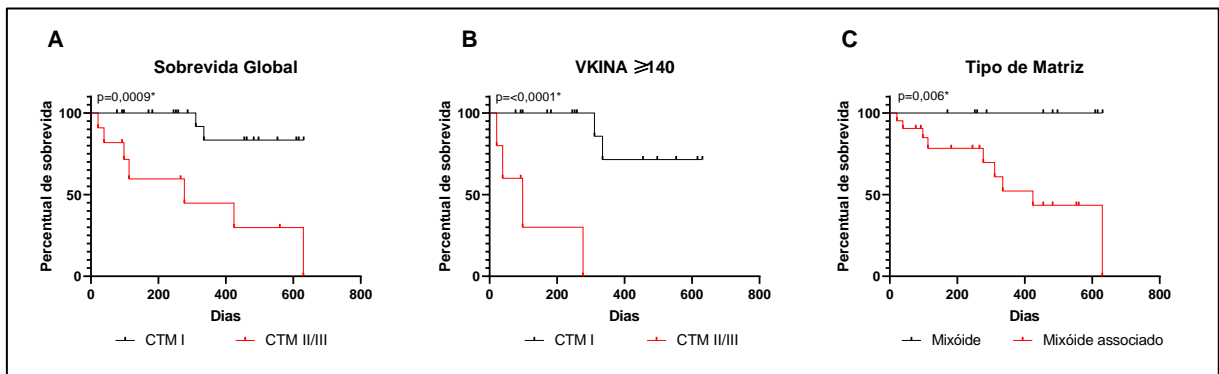
Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.7 Análise das curvas de sobrevivência

Neste estudo, foi possível determinar a sobrevida global de 32 pacientes. A menor sobrevida registrada foi de 21 dias, observada em uma cadela do grupo com carcinoma em tumor misto (CTM) grau III, enquanto a maior sobrevida foi de 631 dias, em uma cadela do grupo CTM I.

A análise da taxa de sobrevida global entre os grupos revelou uma diferença significativa ( $p=0,0009$ ;  $HR=0,115$ ;  $IC=0,027$  a  $0,489$ ), com menor sobrevida observada no grupo CTM II/III. Além disso, a mediana da expressão de VKINA foi utilizada para a análise das curvas de sobrevida. Quando o escore de VKINA era  $\geq 140$ , foi observada uma diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos grupos CTM I e CTM II/III ( $p<0,0001$ ;  $HR=0,068$ ;  $IC=0,005$  a  $0,799$ ) (Figura 7).

Também analisamos a sobrevida em relação ao componente da matriz tumoral. As cadelas com tumores contendo componente metaplásico apresentaram sobrevida significativamente menor ( $p=0,006$ ;  $HR=0,000$ ;  $IC=-1,000$  a  $-1,000$ ) em comparação àquelas com apenas matriz mixóide nos tumores.



**Figura 7. Taxas de sobrevida A.** Sobrevida global. **B.** Sobrevida entre os grupos, com escore de VKINA  $\geq 140$ . **C.** Sobrevida com base com componente da matriz.

CTM: Carcinoma em Tumor Misto.

Teste estatístico: Kaplan-Meier, seguido do teste Log-rank.

Os valores de  $p$  foram considerados significativos quando menores que 0,05.

### 3.8 Análise univariada e multivariada

**Tabela 6. Análise univariada e multivariada do perfil linfocítico e parâmetros clínicos quando o escore de VKINA  $\geq$  140 associados à sobrevida em cadelas portadoras de Carcinomas em Tumores Mistos**

Parâmetros	Univariada <sup>a</sup>		Multivariada <sup>b</sup>		
	IC 95%	p-valor	Odds ratio (IC 95%)	p-valor	
<b>Clínico-patológicos</b>	Estadiamento	-0,645 a 0,301	0,426	-497,4 a 1174	0,345
	Tipo de Matriz	-0,821 a -0,083	0,025*	-718,1 a 37,52	0,068
<b>Sangue Periférico</b>	T CD4+	-0,470 a 0,513	0,914	-7,737 a 9,192	0,833
	T CD8+	-0,467 a 0,516	0,901	-17,07 a 10,60	0,574
<b>Infiltrado Tumoral</b>	T CD4+	-0,598 a 0,369	0,563	-6,842 a 3,710	0,48
	T CD8+	-0,655 a 0,285	0,352	-26,83 a 8,921	0,254
	CD4/ TGFB+	-0,526 a 0,457	0,862	-9,197 a 17,35	0,465
	CD8/ TGFB+	-0,695 a 0,216	0,227	-8,270 a 11,75	0,673
	CD14+	-0,631 a 0,323	0,438	-17,80 a 7,526	0,344
	CD14/ARG+	-0,324 a 0,630	0,441	-8,152 a 10,33	0,773
	CD14/PD1+	-0,396 a 0,577	0,649	-7,526 a 10,88	0,659

Legenda: a: Correlação de Spearman . b: Regressão linear múltipla;

Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 0,05.

Na análise univariada, o tipo de matriz foi o único parâmetro com associação significativa ( $p=0,02$ ). Nenhum dos parâmetros mostrou associação significativa com a sobrevida na análise multivariada

#### 4. Discussão:

Carcinomas em tumores mistos são mais frequentemente tumores mamários em cadelas e são compostos por componentes epiteliais malignos e mesenquimais benignos<sup>49</sup>. Entretanto, sua composição mesenquimal, perfil imunológico e interações com o microambiente tumoral ainda não foram amplamente explorados.

Além disso, o CTM está entre as neoplasias mamárias mais frequente em cadelas<sup>49,53,58</sup> e em 75% dos casos de CTM, observa-se um comportamento biológico favorável, geralmente associados ao estadio I, baixo grau histológico e maior sobrevida global<sup>49</sup>. No entanto, a alta heterogeneidade morfológica e molecular destas neoplasias impõe variações no comportamento biológico, em função dos padrões de proliferação carcinomatosa, bem como no prognóstico<sup>48,58</sup>.

Os achados clínico-patológicos deste estudo estão alinhados com a literatura existente. A idade média das cadelas afetadas<sup>17,48,42</sup> a correlação entre o tamanho tumoral e um prognóstico desfavorável<sup>19</sup>, e a alta frequência de carcinomas em tumores mistos de grau II/III com maior estadiamento clínico<sup>48,54</sup> destacam a importância do diagnóstico precoce.

Embora os carcinomas em tumores mistos sejam frequentemente descritos como neoplasias de comportamento biológico favorável<sup>49</sup>, sua heterogeneidade morfológica pode resultar em variações significativas no prognóstico, dependendo dos padrões de proliferação carcinomatosa<sup>59</sup>. Este aspecto é evidenciado em nossa pesquisa por dois casos de CTM de grau I com metástase para o linfonodo, sugerindo que mesmo os tumores de baixa graduação podem, ocasionalmente, ter comportamentos atípicos. Essa variabilidade ressalta a necessidade de estudos adicionais para um entendimento mais profundo das causas desses comportamentos divergentes.

De forma semelhante, também são escassos ou inexistentes estudos sobre os componentes mesenquimais/metaplásicos do CTM. De forma interessante, nossos resultados indicam que esses componentes (matriz mixoide, associada a um componente mesenquimal) podem indicar um fator de agressividade tumoral, diante da maior frequência desses componentes nos CTM de grau II/III e nos casos de metástase para linfonodos. Em mulheres, a metaplasia observada nos carcinomas metaplásicos mamários, que morfologicamente se assemelharia ao Carcinoma em Tumor Misto nas cadelas é atribuída à transição epitélio-mesênquima (TEM).<sup>22</sup>

Segundo o consenso mais recente, a TEM é um processo sequencial e reversível em que células epiteliais perdem sua polaridade, modulam o citoesqueleto, reduzem propriedades de adesão e adquirem características mesenquimais, aumentando a motilidade e a capacidade invasiva.<sup>72</sup> Estudos recentes mostram que muitos carcinomas metaplásicos mamários exibem alta expressão de moléculas indutoras da TEM e marcadores de células tumorais <sup>22,2,1</sup>. Em cadelas, a TEM também influencia o comportamento metastático dos tumores mamários <sup>58,61</sup> modificando o microambiente tumoral, mas ainda não há estudos específicos com amostras suficientes em carcinomas em tumores mistos.

O microambiente imunológico tumoral tem sido amplamente estudado devido ao duplo papel do sistema imunológico em neoplasias mamárias, influenciando tanto a progressão quanto a regressão tumoral, além de impactar a resposta ao tratamento e as taxas de sobrevida <sup>17,16,15,68</sup>. Neste estudo, observou-se que os níveis de linfócitos T CD3<sup>+</sup> no sangue periférico foram maiores em cadelas saudáveis em comparação com aquelas com CTM, o que corrobora a literatura existente, que aponta uma redução na infiltração de células T CD3<sup>+</sup> em tumores.<sup>38</sup> No entanto, as razões para essa diminuição ainda não são completamente compreendidas <sup>69</sup> destacando o potencial dos linfócitos T CD3<sup>+</sup> como biomarcadores promissores do estado da doença <sup>8,38</sup>

De modo geral, observamos que a proporção de linfócitos TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico foi maior do que a de T CD8<sup>+</sup>, especialmente no grupo CTM I. Isso é consistente com a literatura, que associa linfócitos TCD8<sup>+</sup> a tumores menos agressivos.<sup>8</sup> Além disso, uma maior infiltração de TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico está relacionada a uma melhor sobrevida global e livre de doença em casos de tumores mamários triplo negativos em mulheres.<sup>35</sup> As proporções observadas entre CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> no sangue periférico corroboram os achados na literatura, no qual razões superiores a 1,8 estão associados a menor sobrevida<sup>16</sup> como observado no grupo CTM II/III [1,9]

A avaliação dos linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) já demonstrou o seu valor prognóstico em tumores mamários de mulheres<sup>41,21,63</sup> e principalmente T CD8<sup>+</sup> foram preditores independentes de resposta patológica completa em câncer de mama invasivo.<sup>18</sup> Não houve diferenças entre as expressões de T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos grupos experimentais. No entanto, em cadelas é descrito maior frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> associada à ocorrência de metástase, enquanto a maior frequência dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> foi observada nos tumores de melhor prognóstico e sem metástases<sup>17</sup> o que difere em parte dos nossos resultados, visto que observamos maior infiltração de T CD8<sup>+</sup> no CTM de grau II/III

A IL-12, a principal citocina pró inflamatória expressa por células apresentadoras de antígeno, células dendríticas, macrófagos ativados e regulam a diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> em células Th1.<sup>26,25</sup> Este é o primeiro estudo que realiza a avaliação de IL-12 em carcinomas em tumores mistos de cadelas e abre perspectivas para estudos mais aprofundados que norteiem intervenções baseadas em imunoterapia visando o controle do crescimento tumoral e respostas citotóxicas mais eficazes.

A ativação de células Th1 mediada por IL-12 resulta na liberação de citocinas específicas, como o IFN- $\gamma$ , que recrutam células T citotóxicas, como Natural Killers (NK) e CD8<sup>+</sup>, além de colaborarem com macrófagos M1, que combatem microrganismos e promovem

respostas antitumorais eficientes.<sup>39,25</sup> Por outro lado, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> também podem se diferenciar em células T auxiliares Th2, que liberam citocinas como IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, estimulando macrófagos M2 associados ao tumor, os quais suprimem linfócitos T citotóxicos e estudo, os resultados sugerem que em casos de CTM I há maior ativação de macrófagos antitumorais em comparação com CTM II/III.

Além de sua importância na ativação de respostas imunes antitumorais efetivas, a IL-12 atua inibindo diretamente a supressão imunológica, modulando as células que regulam a resposta imune antitumoral contra células cancerígenas.<sup>37,44</sup> O desequilíbrio entre as respostas Th1/Th2, com polarização para Th2, pode impactar o desenvolvimento tumoral, e a relação Th1/Th2 já foi identificada como um fator prognóstico significativo em câncer de mama dos subtipos Luminal A e Basal-like.<sup>71</sup>

O fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma citocina reguladora pleiotrópica envolvida em diversos processos fisiopatológicos, incluindo a carcinogênese e as respostas imunes.<sup>73,4</sup> Em condições equilibradas nos ambientes tumorais, o TGF- $\beta$  pode atuar como um gene supressor de tumor, inibindo a proliferação celular, regulando a diferenciação e promovendo a apoptose.<sup>4</sup> Entretanto, células tumorais podem secretar TGF- $\beta$  para explorar seus efeitos inibitórios sobre outras células do microambiente tumoral, aumentando seu potencial invasivo e metastático,<sup>29, 73, 4</sup> fenômeno é confirmado em nosso estudo pela alta expressão de TGF- $\beta$  no grupo mais agressivo.

No microambiente tumoral, o TGF- $\beta$  estimula metaloproteinases que degradam a matriz extracelular, facilitando a entrada de monócitos que se diferenciam em macrófagos com fenótipos pró-tumorigênicos, secretando arginase e promovendo um estado imunossupressor.<sup>23</sup> Além disso, o TGF- $\beta$  desempenha um papel na imunidade antitumoral ao promover a produção de interleucina-10, que suprime a imunidade antitumoral e inibe citocinas como interferon-gama e granzima B em células NK e T CD8<sup>+</sup>.<sup>43</sup> Curiosamente, não foram observadas correlações com as expressões de arginase e granzima nos grupos tumorais, sugerindo uma mudança fenotípica do TGF- $\beta$  no grupo CTM. Um maior número amostral deste subtipo histológico pode esclarecer a imunossupressão relacionada ao TGF- $\beta$ . Estudos recentes têm investigado os múltiplos efeitos do TGF- $\beta$ , levantando questões sobre se a inibição de sua sinalização poderia, na verdade, agravar o câncer em vez de tratá-lo.<sup>40,36,73</sup>

A VKINA é uma matriquina bioativa derivada da proteólise do VCAN na matriz extracelular.<sup>64</sup> Ela desempenha funções importantes na fisiologia dos processos de desenvolvimento e cicatrização de tecidos<sup>51</sup>, além de estar envolvida no crescimento tumoral e metástase.<sup>57</sup> A ação imunorreguladora da VKINA foi demonstrada em mielomas, onde estimula citocinas inflamatórias quimioatraentes e a diferenciação de precursores de células dendríticas<sup>28,27</sup>, o que pode contribuir para uma resposta antitumoral.<sup>12,28</sup>

Em mielomas, carcinomas colorretais e mamários, a alta expressão de VKINA foi correlacionada com maior infiltração de linfócitos TCD8<sup>+</sup> (HOPE et al., 2017; KRAUS et al., 2022; EMMERICH et al., 2020). Esses achados corroboram nosso estudo, onde observamos uma correlação entre a expressão de VKINA (ponto de corte  $\geq 140$ ) e linfócitos TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico do grupo CTM I, que apresenta menor agressividade tumoral. Isso sugere que a VKINA pode ter um efeito antitumoral nesse grupo.

No presente estudo, não foram encontradas correlações entre a expressão de VKINA e parâmetros clínico-patológicos, como tamanho tumoral e estadiamento clínico, o que está de acordo com a literatura existente, que também não relata essa correlação. No entanto, observa-se que a alta expressão de VKINA está associada à menor sobrevida,<sup>12</sup> destacando sua importância na progressão tumoral.

A interação entre a matriz extracelular e os componentes inflamatórios é dinâmica e pode apresentar fases de remodelamento diferentes.<sup>51</sup> Inicialmente a VKINA estimula, via células dendríticas, as células T efetoras na vigilância antitumoral.<sup>45</sup> Em seguida, pode haver

uma fase de vigilância imunológica ativa, mas progressivamente ineficaz, quando há um equilíbrio precário entre VKINA, linfócitos, células dendríticas, porém com a propagação dos tumores.<sup>11</sup>

Na fase tardia, fibrose progressiva mediada por TGF- $\beta$  e acúmulo progressivo de VCAN não clivado resulta na imunossupressão e escape imunológico.<sup>11,51</sup> Assim, a correlação positiva observada entre a expressão de TGF- $\beta$  e VKINA no grupo CTM I podem indicar a ação imuno reguladora da VKINA, e possivelmente o oposto nos CTM de maior graduação.

Conforme esperado, as pacientes do grupo CTM I apresentaram maior taxa de sobrevida global em comparação com o grupo CTM II/III. Isso ocorre porque a graduação é um fator prognóstico independente,<sup>6</sup> e o grupo CTM II/III predominou em tumores grandes, o que também influencia diretamente o prognóstico.<sup>19</sup>

Em mielomas múltiplos, a alta expressão de VKINA está associada a menor sobrevida global e livre de doença (DHAKAL et al., 2019). No nosso estudo, ao analisar a graduação histológica, a alta expressão de VKINA ( $\geq 140$ ) foi associada a uma pior sobrevida no grupo CTM II/III. Isso sugere que esse proteólito influencia o comportamento biológico e a agressividade tumoral nesse grupo, semelhante aos outros achados em nosso grupo de pesquisa<sup>62</sup> (*in press*).

O componente metaplásico impactou negativamente a sobrevida das cadelas neste estudo, corroborando a hipótese de que esses elementos contribuem para a agressividade tumoral. Isso é especialmente relevante em comparação com casos em que apenas a matriz mixoide é observada. Além disso, destaca-se a importância de estudos focados nos componentes mesenquimais/metaplásicos de carcinomas em tumores mistos, bem como no processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM), uma vez que não há relatos anteriores sobre esses aspectos. Na análise univariada, o tipo de matriz foi o único parâmetro com associação significativa. Entretanto, este parâmetro perdeu significância na análise multivariada. Estes resultados sugerem que, isoladamente, o tipo de matriz pode ter um impacto na sobrevida das cadelas, mas essa associação não se mantém quando ajustada para outros fatores na análise multivariada.

As limitações desse estudo incluem a falta da análise morfométrica do infiltrado inflamatório para a determinação dos tipos celulares envolvidos e a formação de um grupo exclusivo de CTM grau III para avaliação de fatores relacionados à maior agressividade tumoral, uma vez que possui baixa frequência. Contudo, acreditamos que o objetivo do nosso estudo foi alcançado através da identificação das diferenças do perfil imune, matriz extracelular e VKINA nos CTM de cadelas e suas correlações com a agressividade tumoral.

No caso do carcinoma em tumor misto, a heterogeneidade associada a seus componentes epiteliais e mesenquimais parece influenciar ainda mais essas interações ocorridas no microambiente tumoral. Nossos dados permitem concluir que o componente mesenquimal observados no CTM, influencia na agressividade tumoral, maior graduação, metástase nodal e menor sobrevida de cadelas com CTM e esses componentes mesenquimais/metaplásicos precisam ser melhor investigados, visto que as informações na literatura são escassas na veterinária. Além disso, o perfil inflamatório associado a citocinas como IL12 expressas pelos linfócitos TCD4 podem auxiliar o CTM I no combate tumoral. Já em tumores de maior agressividade parece haver mudança no estado de ativação de moléculas TGF- $\beta$ , o que favorece o desenvolvimento do tumor, assim como, a maior expressão de VKINA presente na matriz extracelular, esteve associada a menor sobrevida das cadelas. Em carcinomas em tumores mistos pouco se sabe sobre a interação da VKINA com o perfil linfocítico, e no conhecimento dos autores, esse é o primeiro estudo a trazer a relação da VKINA com IL12 e TGF- $\beta$  nesse subtipo histológico.

### **Declaração de ética**

O estudo animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com número de protocolo 16/2021

### **Financiamento**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela Bolsa MPRP (Proc. 88887.596070/2020-00). AE-L (Proc. 310248/2021-3) é bolsista de produtividade em pesquisa e desenvolvimento tecnológico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses

### **Agradecimentos**

Todos os autores agradecem gentilmente às principais instalações do Instituto Gonçalo Muniz - Fundação Oswaldo Cruz Fiocruz/ Bahia e Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

### **Referências**

1. Akrida I, Mulita F, Plachouri KM, Benetatos N, Maroulis I, Papadaki H. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in metaplastic breast cancer and phyllodes breast tumors. 2024;41(1):1–12.
2. Barrientos-Toro EN, Ding Q, Raso MG. Translational Aspects in Metaplastic Breast Carcinoma. Vol. 16, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) 2024:
3. Bujak JK, Szopa IM, Pingwara R, et al. The expression of selected factors related to T lymphocyte activity in canine mammary tumors. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):1–19.
4. Van den Bulk J, de Miranda NFCC, ten Dijke P. Therapeutic targeting of TGF- $\beta$  in cancer: Hacking a master switch of immune suppression. Vol. 135, *Clinical Science*. Portland Press Ltd 2021:35–52.
5. Carvalho MI, Pires I, Prada J, Queiroga FL. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. Vol. 2014, *BioMed Research International*. 2014:
6. Cassali GD, Lavallo GE, Nardi a. B De, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. 2014;4(2):153–180.
7. Cassali GD, Damasceno KA, Bertagnolli AC, et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors: Benign mixed tumors, carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas. 2017;10(3):87–99.
8. Chen Y-L, Loh Z-J, Lee K-T, Lai M-D, Hsu H-P. Circulating CD3+ CD8+ T lymphocytes as indicators of disease status in patients with early breast cancer. 2023.
9. Corso G, Frassoni S, Girardi A, et al. Metaplastic breast cancer: Prognostic and therapeutic considerations. *J Surg Oncol*. 2021;123(1):61–70.
10. Damasceno KA, dos Santos-Conceição AM, Silva LP, et al. Factors related to the suppression of the antitumour immune response in female dogs with inflammatory mammary carcinoma. *PLoS One*. 2022;17(5 May).

11. Deb G, Cicala A, Papadas A, Asimakopoulos F. Matrix proteoglycans in tumor inflammation and immunity. Vol. 323, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. American Physiological Society 2022:C678–C693.
12. Dhakal B, Pagenkopf A, Mushtaq MU, et al. Versican proteolysis predicts immune effector infiltration and post-transplant survival in myeloma. Vol. 60, *Leukemia and Lymphoma*. Taylor and Francis Ltd 2019:2558–2562.
13. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*. 1991;41(3A):151–152, discussion 152-3.
14. Emmerich P, Deming DA, Matkowskyj K, Halberg R. VCAN accumulation and proteolysis play critical roles in directing CD8 + TILs and response to ICIs in solid tumors.
15. Estrela-Lima A, Araújo MSS, Soares RP, et al. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. *Vet Comp Oncol*. 2016;14(1):88–100.
16. Estrela-Lima A, Araújo MSS, Da Costa-Neto JM, et al. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;131(3):751–763.
17. Estrela-Lima A, Ss Araújo M, Costa-Neto JM, et al. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. Vol. 10, *BMC Cancer*. 2010.
18. Feng J, Yi J, Zouxu X, et al. Peripheral blood lymphocytes subtypes as new predictors for neoadjuvant therapy efficacy in breast cancer. *Cancer Med*. 2022;11(15):2923–2933.
19. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol*. 2009;7(4):230–235.
20. Ferreira T, Gama A, Seixas F, et al. Mammary Glands of Women, Female Dogs and Female Rats: Similarities and Differences to Be Considered in Breast Cancer Research. *Vet Sci*. 2023;10(6):379.
21. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2020;20(1).
22. García-Martínez E, Gil GL, Benito AC, et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. 2014;16(1).
23. Gonzalez-Junca A, Driscoll KE, Pellicciotta I, et al. Autocrine TGF $\beta$  is a survival factor for monocytes and drives immunosuppressive lineage commitment. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(2):306–320.
24. Gray M, Meehan J, Martínez-Pérez C, et al. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. 2020:
25. Habanjar O, Bingula R, Decombat C, Diab-Assaf M, Caldefie-Chezet F, Delort L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) 2023:
26. Hong CC, Yao S, McCann SE, et al. Pretreatment levels of circulating Th1 and Th2 cytokines, and their ratios, are associated with ER-negative and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):477–488.

27. Hope C, Emmerich PB, Papadas A, et al. Versican-Derived Matrikines Regulate Batf3–Dendritic Cell Differentiation and Promote T Cell Infiltration in Colorectal Cancer. 2017;199(5):1933–1941.
28. Hope C, Foulcer S, Jagodinsky J, et al. Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. *Blood*. 2016;128(5):680–685.
29. Ihara S, Hirata Y, Koike K. TGF- $\beta$  in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. Vol. 52, *Journal of Gastroenterology*. Springer Tokyo 2017:777–787.
30. Kashyap R, Vellathussery Chakkalakkombil S, Ch. Toi P, Satheesan D. Metaplastic breast carcinoma with osseous differentiation presenting as calcified breast mass—Radio-pathological correlation. Vol. 26, *Breast Journal*. Blackwell Publishing Inc. 2020:1825–1827.
31. Kim NH, Lim HY, Im KS, Kim JH, Sur JH. Identification of Triple-negative and Basal-like Canine Mammary Carcinomas using Four Basal Markers. *J Comp Pathol*. 2013;148(4):298–306.
32. Kraus SG, Matkowskyj KA, Emmerich PB, et al. Abstract 3842: Versican proteolysis is a predictive biomarker of tumor infiltrating lymphocytes within primary and metastatic colorectal cancer tumors. *Cancer Res*. 2022;82(12\_Supplement):3842–3842.
33. Kuppusamy K, Rajan CRP- A, Rose Varghese CRP- G, et al. Pathological and Molecular Analysis of Spontaneous Canine Mammary Carcinomas and its Prognostic implications. 2023.
34. Kwon JY, Moskwa N, Kang W, Fan TM, Lee C. Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor. Vol. 26, *Journal of Breast Cancer*. Korean Breast Cancer Society 2023:1–13.
35. Li M, Xu J, Jiang C, Zhang J, Sun T. Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood T-Cell Subsets in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 2022;12.
36. Li R, Wen A, Lin J. Pro-inflammatory cytokines in the formation of the pre-metastatic niche. Vol. 12, *Cancers*. MDPI AG 2020:1–16.
37. Lin L, Rayman P, Pavicic PG, et al. Ex vivo conditioning with IL-12 protects tumor-infiltrating CD8 + T cells from negative regulation by local IFN- $\gamma$ . 2019;68(3):395–405.
38. Lisiecka U, Brodzki P, Śmiech A, et al. The diagnostic value of selected immune parameters in peripheral blood of dogs with malignant mammary tumours - a preliminary study. 2024;68(2):271–278.
39. Liu J, Geng X, Hou J, Wu G. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. Vol. 21, *Cancer Cell International*. BioMed Central Ltd 2021:
40. Liu M, Kuo F, Capistrano KJ, et al. TGF- $\beta$  suppresses type 2 immunity to cancer. *Nature*. 2020;587(7832):115–120.
41. Loi S, Drubay D, Adams S, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. 2019;37(7):559–569.
42. Machado MC, Da Costa-Neto JM, Portela RD, et al. The effect of naltrexone as a carboplatin chemotherapy-associated drug on the immune response, quality of life and survival of dogs with mammary carcinoma. *PLoS One*. 2018;13(10):1–16.
43. Maruyama T, Chen W, Shibata H. TGF- $\beta$  and Cancer Immunotherapy. Vol. 45, *Biol. Pharm. Bull*. 2022.
44. Mirlekar B, Pylayeva-Gupta Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. 2021;13(2):167.
45. Mittal N, Sung H Yun, Hirokazu Enomoto, et al. Versican Facilitates the Differentiation and Migration of Endothelial Progenitor Cells in Yolk Sac for Vasculogenesis. 2013:
46. Nandadasa S, Foulcer S, Apte SS. The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis. Vol. 35, *Matrix Biology*. Elsevier 2014:34–41.

47. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, Papageorgis P. cancers The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. 2021.
48. Nunes FC, Campos CB, Teixeira S V., Bertagnolli AC, Lavallo GE, Cassali GD. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2018;70(6):1714–1722.
49. Nunes FC, Damasceno KA, de Campos CB, Bertagnolli AC, Lavallo GE, Cassali GD. Mixed tumors of the canine mammary glands: Evaluation of prognostic factors, treatment, and overall survival. *Vet Anim Sci.* 2019;7.
50. Owen L. TNM Classification of tumours in domestic animals. 1980:1–52.
51. Papadas A, Arauz G, Cicala A, Wiesner J, Asimakopoulos F. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. Vol. 68, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* SAGE Publications Ltd 2020:871–885.
52. Papadas A, Deb G, Cicala A, et al. Stromal remodeling regulates dendritic cell abundance and activity in the tumor microenvironment. *Cell Rep.* 2022;40(7).
53. Pastor N, Caballé NC, Santella M, Ezquerro LJ, Tarazona R, Duran E. Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. 2018;50:143–147.
54. Patel S, Maso CJ. Ossification in Metastases from Carcinoma of the Breast. 1966;198(12):1309–1311.
55. Pett MA, Lackey NR, Sullivan JJ. Making Sense of Factor Analysis Evaluating. 2011:167–206.
56. Popova N V., Jücker M. The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer. Vol. 14, *Cancers.* MDPI 2022:
57. Raposo-Ferreira TMM, Brisson BK, Durham AC, et al. Characteristics of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Primary and Paired Metastatic Canine Mammary Carcinomas. *Vet Pathol.* 2018;55(5):622–633.
58. Rauber D, Gerardi DG, Oliveira LO, et al. Clinical presentation, histological findings, and prognosis in female dogs with mixed mammary neoplasms. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2023;75(2):174–184.
59. Reis J, Oliveira T, Pereira A, Infante P, Leal N, Faísca P. Microtomographic characterization of calcifications in canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol.* 2019(March):1–11.
60. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. Vol. 26, *Annals of Oncology.* Oxford University Press 2015:259–271.
61. SOUZA MCS. POTENCIAL BIOMARCADOR DA PROTEÓLISE DE VERSICAN NO CÂNCER DE MAMA: UM ESTUDO EM MODELO CANINO. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ INSTITUTO GONÇALO MONIZ - MESTRADO. 2021.
62. Spathas N, Goussia AC, Koliou GA, et al. Association between CD8+ Tumor Infiltrating Lymphocytes and the Clinical Outcome of Patients with Operable Breast Cancer Treated with Adjuvant Dose-Dense Chemotherapy—A 10 Year Follow-Up Report of a Hellenic Cooperative Oncology Group Observational Study. 2022;14(22):5635.
63. Timms KP, Maurice SB. Context-dependent bioactivity of versican fragments. Vol. 30, *Glycobiology.* Oxford University Press 2020:365–373.
64. Toss MS, Miligy I, Al-Kawaz A, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in ductal carcinoma in situ of the breast. 2018;31(8):1226–1236.
65. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C, Trapani D, Antonarelli G, Curigliano G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. Vol. 15, *Cancers.* MDPI 2023:
66. Vgenopoulou S, Lazaris AC, Markopoulos C, et al. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type. 2003;12(3):172–178.

67. Vieira-Filho CHC, Barrouin-Melo SM, Damasceno KA, et al. Tumor-associated macrophage is correlated with survival and SOCS protein expression in canine mammary carcinoma. 2018;38(10):1972–1980.
68. Watanabe H. Versican and versikine: The dynamism of the extracellular matrix. 2023;1(4).
69. Wight TN, Kang I, Merrilees MJ. Versican and the control of inflammation. 2014;35:152–161.
70. Xiao Y, Huang Y, Jiang J, Chen Y, Wei C. Identification of the prognostic value of Th1/Th2 ratio and a novel prognostic signature in basal-like breast cancer. *Hereditas*. 2023;160(1).
71. Yang J, Xu J, Ying E, Sun T. Predictive and prognostic value of circulating blood lymphocyte subsets in metastatic breast cancer. *Cancer Med*. 2019;8(2):492–500.
72. Zhao H, Wei J, Sun J. Roles of TGF- $\beta$  signaling pathway in tumor microenvironment and cancer therapy. Vol. 89, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V. 2020:

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de mama em cadelas e mulheres apresenta alta frequência e semelhanças biológicas, que torna os estudos em cães modelos comparativos e translacionais relevantes para pacientes humanas. Em ambas as espécies o microambiente tumoral desempenha um papel importante na etiopatogenia. Neste estudo, foram avaliadas as possíveis interações entre o perfil imunológico e o microambiente tumoral em diferentes tumores mamários caninos, bem como suas influências na agressividade dos tumores.

Os resultados obtidos confirmam estudos anteriores no campo da imunologia tumoral, destacando a importância dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxicos ativados no combate aos tumores. As interações entre as células tumorais, a modulação do sistema imunológico e os componentes da matriz extracelular são alvos de estudos recentes.

A proteína VKINA interfere no microambiente tumoral, geralmente favorecendo a progressão do tumor; contudo, sua ação imunomoduladora pode variar dependendo do contexto, da fase da doença (inicial ou terminal) e de sua capacidade de se ligar a múltiplos receptores. No presente estudo observou-se que a VKINA ainda não pode ser considerada um marcador prognóstico independente, mas sua expressão aumentada correlacionou-se diretamente com a graduação histológica, alta expressão de TGFβ<sup>+</sup> e menor sobrevida nos tumores mamários caninos.

Em carcinomas em tumores mistos (CTM) de baixo grau, o perfil inflamatório associado a citocinas como IL12, expressas pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, pode auxiliar destruição das células tumorais. Em CTM de maior agressividade, a expressão elevada de moléculas TGF-β favorece o desenvolvimento tumoral. Pouco se sabe sobre a interação da VKINA com o perfil linfocítico em CTM, sendo este, no conhecimento dos autores, o primeiro estudo a relacionar a VKINA com IL12 e TGF-β<sup>+</sup> nesse subtipo histológico.

Outro foco importante do estudo foi a avaliação de componentes mesenquimais em CTM. A heterogeneidade associada aos elementos epiteliais e mesenquimais parece intensificar as interações no microambiente tumoral. Nossos dados indicam que o componente mesenquimal/metaplásico presente em CTM influencia a agressividade tumoral, aumentando a graduação, metástase nodal e reduzindo a sobrevida em cadelas com CTM, destacando a necessidade de mais investigações devido à escassez de informações na literatura veterinária.

Diante desses dados, futuras pesquisas podem elucidar ainda mais a interação das células tumorais com os componentes do sistema imunológicos, a influência da VKINA na agressividade tumoral e sua ação imunomoduladora, sobretudo em diferentes tipos histológicos,

a fim de trazer novas perspectivas prognósticas e terapêuticas, tanto para a espécie canina, quanto para as mulheres.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, J.; NGUYEN, F.; LOUSSOUARN, D.; PEÑA, L.; GAMA, A.; RIEDER, N.; BELOUSOV, A.; BEMELMANS, I.; JAILLARDON, L.; IBISCH, C.; CAMPONE, M. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 167, n. 2, p. 459–468, 2018.

ALTHOBITI, M.; ALESKANDARANY, M. A.; JOSEPH, C.; TOSS, M.; MONGAN, N.; DIEZ-RODRIGUEZ, M.; NOLAN, C. C.; ASHANKYTY, I.; ELLIS, I. O.; GREEN, A. R.; RAKHA, E. A. Heterogeneity of tumour-infiltrating lymphocytes in breast cancer and its prognostic significance. **Histopathology**, v. 73, n. 6, p. 887–896, 2018.

BOKIL, A. A. *et al.* Discovery of a new marker to identify myeloid cells associated with metastatic breast tumours. **Cancer Cell International**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

BUJAK, J. K.; SZOPA, I. M.; PINGWARA, R.; KRUCZYK, O.; KRZEMIŃSKA, N.; MUCHA, J.; MAJCHRZAK-KULIGOWSKA, K. The expression of selected factors related to t lymphocyte activity in canine mammary tumors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 1–19, 2020.

CARVALHO, M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. A role for T-lymphocytes in human breast cancer and in canine mammary tumors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

CASSALI, G. D. Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana. **tese**, n. September 1978, p. 80, 2000.

CASSALI, G. D. *et al.* Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153–180, 2014.

CASSALI, G. D. *et al.* **Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019** **Brazilian Journal of Veterinary Pathology** **Brazilian Association of Veterinary Pathology**, , 2020.

CASSALI, G. D.; BERTAGNOLLI, C.; FERREIRA, E.; ARA, K.; DAMASCENO, U.; GAMBA, C. D. O. Caninos Mammary Mixed Tumores : uma revisão. 2012.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**, v. 11, p. 56–64, 2006.

CHENG, Y.; SUN, H.; WU, L.; WU, F.; TANG, W.; WANG, X.; LV, C. Vup-regulation of vcan promotes the proliferation, invasion and migration and serves as a biomarker in gastric cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 8665–8675, 2020.

CHOW, L.; SOONTARARAK, S.; WHEAT, W.; AMMONS, D.; DOW, S. **Canine polarized macrophages express distinct functional and transcriptomic profiles**. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 988981, 1 nov. 2022

CLEARY, M. P.; GROSSMANN, M. E.; RAY, A. Effect of obesity on breast cancer development. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 2, p. 202–213, 2010.

COPPOLA, L.; SMALDONE, G.; D'AIUTO, M.; D'AIUTO, G.; MOSSETTI, G.; RINALDO, M.; VERTICILLO, S.; NICOLAI, E.; SALVATORE, M.; MIRABELLI, P. Identification of Immune Cell Components in Breast Tissues by a Multiparametric Flow Cytometry Approach. **Cancers**, v. 14, n. 16, 1 ago. 2022.

DAMASCENO, K. A.; FERREIRA, ; ESTRELA-LIMA, ; BOSCO, ; SILVA, ; BARROS, ; BERTAGNOLLI, ;; CASSALI, ; **RELATIONSHIP BETWEEN THE EXPRESSION OF VERSICAN AND EGFR, HER-2, HER-3 AND CD44 IN MATRIX-PRODUCING TUMOURS IN THE CANINE MAMMARY GLAND**. Salvador, Bahia: [s.n.].2023.

DAMASCENO, K. A.; SANTOS-CONCEIÇÃO, A. M. DOS; SILVA, L. P.; SOUZA CARDOSO, T. M. DE; COSTA VIEIRA-FILHO, C. H. DA; SANTOS FIGUERÊDO, S. H.; MARTINS-FILHO, E.; OLIVEIRA DE FARIA, B. G.; COSTA-NETO, J. M. DA; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A. Factors related to the suppression of the antitumour immune response in female dogs with inflammatory mammary carcinoma. **PLoS ONE**, v. 17, n. 5 May, 1 maio 2022.

DHAKAL, B. *et al.* **Versican proteolysis predicts immune effector infiltration and post-transplant survival in myelomaLeukemia and Lymphoma**Taylor and Francis Ltd, , 24 ago. 2019.

DIEDERICHSEN, A. C. P.; HJELMBORG, J. V. B.; CHRISTENSEN, P. B.; ZEUTHEN, J.; FENGE, C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 52, n. 7, p. 423–428, 1 jul. 2003.

EBLE, J. A.; NILAND, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis** 2019 36:3, v. 36, n. 3, p. 171–198, 11 abr. 2019.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term

follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. **Histopathology**, v. 41, n. 3A, p. 151–2, discussion 152-3, 1991.

ERDÉLYI, I.; ASTEN, A. J. A. M. VAN; DIJK, J. E. VAN; NEDERBRAGT, H. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 124, n. 2, p. 139–149, 9 ago. 2005.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M. DA; RIBEIRO, L. G. R.; DAMASCENO, K. A.; D’ASSIS, M. J. M. H.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 131, n. 3, p. 751–763, fev. 2012.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

FENG, J.; YI, J.; ZOUXU, X.; LI, J.; XIONG, Z.; HUANG, X.; ZHONG, W.; HUANG, W.; YE, F.; WANG, X. Peripheral blood lymphocytes subtypes as new predictors for neoadjuvant therapy efficacy in breast cancer. **Cancer Medicine**, v. 11, n. 15, p. 2923–2933, 1 ago. 2022.

FERREIRA, T.; GAMA, A.; SEIXAS, F.; FAUSTINO-ROCHA, A. I.; LOPES, C.; GASPAR, V. M.; MANO, J. F.; MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, P. A. Mammary Glands of Women, Female Dogs and Female Rats: Similarities and Differences to Be Considered in Breast Cancer Research. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 6, p. 379, 30 maio 2023.

FIGUERÊDO, S. H.; NETO, R. S. C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D.; ESTRELA-LIMA, A.; DAMASCENO, K. A. Expression of VCAN and its receptors in canine mammary carcinomas with or without myoepithelial proliferation. **Research in Veterinary Science**, v. 140, p. 56–63, 1 nov. 2021.

FLECHER, M. C.; BALABRAM, D.; SALLES, Y. A.; SOUZA, F. R.; ESTRELA-LIMA, A.; NAKAGAKI, K. Y. R.; CASSALI, G. D. Evaluation of immunophenotype and inflammation in canine mammary neoplasms with solid arrangement. **Journal of Comparative Pathology**, v. 213, p. 1–9, 1 ago. 2024.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. **The extracellular matrix at a glance***Journal of Cell Science*, 15 dez. 2010.

FREY, H.; SCHROEDER, N.; MANON-JENSEN, T.; IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 10, p. 2165–2179, 1 maio 2013.

GAO, G.; WANG, Z.; QU, X.; ZHANG, Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, 4 mar. 2020.

GARDEN, O. A.; VOLK, S. W.; MASON, N. J.; PERRY, J. A. **Companion animals in comparative oncology: One Medicine in action**. *Veterinary Journal*, v. 240, p. 6–13, 1 out. 2018.

GIRALDO, N. A.; SANCHEZ-SALAS, R.; PESKE, J. D.; VANO, Y.; BECHT, E.; PETITPREZ, F.; VALIDIRE, P.; INGELS, A.; CATHELIN, X.; FRIDMAN, W. H.; SAUTÈS-FRIDMAN, C. **The clinical role of the TME in solid cancer***British Journal of Cancer* Nature Publishing Group, , 8 jan. 2019.

GOLDSCHMIDT, M. H.; PEÑA, L.; RASOTTO, R.; ZAPPULLI, V. Classification and grading of canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 117–131, 2011.

GRAY, M.; MEEHAN, J.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C.; KAY, C.; TURNBULL, A. K.; MORRISON, L. R.; PANG, L. Y.; ARGYLE, D. **Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer***Frontiers in Oncology* Frontiers Media S.A., , 28 abr. 2020.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. **Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences***Immunity* Cell Press, , 16 jul. 2019.

GUAN, X.; GUO, H.; GUO, Y.; HAN, Q.; LI, Z.; ZHANG, C. **Perforin 1 in Cancer: Mechanisms, Therapy, and Outlook***Biomolecules* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 ago. 2024.

HANAMURA, T. *et al.* Immunological profiles of the breast cancer microenvironment represented by tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

HARTMANN, N.; GIESE, N. A.; GIESE, T.; POSCHKE, I.; OFFRINGA, R.; WERNER, J.; RYSCHICH, E. Prevailing role of contact guidance in intrastromal T-cell trapping in human pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 13, p. 3422–3433, 1 jul. 2014.

HOPE, C. *et al.* Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. **Blood**, v. 128, n. 5, p. 680–685, 4 ago. 2016.

Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde (INCA). <https://www.gov.br/inca/pt-br>

JEONG, H.; HWANG, I.; KANG, S. H.; SHIN, H. C.; KWON, S. Y. Tumor-associated macrophages as potential prognostic biomarkers of invasive breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 22, n. 1, p. 38–51, 1 mar. 2019.

KARINE A DAMASCENO, ANGÉLICA C BERTAGNOLLI, ALESSANDRA ESTRELA-LIMA, LORENA GR RIBEIRO, BRUNA S RABELO, CECÍLIA B CAMPOS, A. L. B. AND G. D. C. 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, n. 1, p. 195, 2012.

KIM, N. H.; LIM, H. Y.; IM, K. S.; KIM, J. H.; SUR, J. H. Identification of Triple-negative and Basal-like Canine Mammary Carcinomas using Four Basal Markers. **Journal of Comparative Pathology**, v. 148, n. 4, p. 298–306, 2013.

KIM, S. H.; SEUNG, B. J.; CHO, S. H.; LIM, H. Y.; BAE, M. K.; SUR, J. H. **Arginase-1 and P-glycoprotein are downregulated in canine hepatocellular carcinoma.** Journal of Veterinary Science, v. 22, n. 5, p. e61, 2021

KIM, S. K.; CHO, S. W. **The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment**Frontiers in PharmacologyFrontiers Media S.A., 24 maio 2022.

KODAMA, J.; HASENGAOWA; KUSUMOTO, T.; SEKI, N.; MATSUO, T.; OJIMA, Y.; NAKAMURA, K.; HONGO, A.; HIRAMATSU, Y. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 2, p. 269–274, 1 fev. 2007.

KRAUS, S. G.; MATKOWSKYJ, K. A.; EMMERICH, P. B.; ZHANG, W.; CLIPSON, L.; PASCH, C. A.; DEMING, D. A. Abstract 3842: Versican proteolysis is a predictive biomarker of tumor infiltrating lymphocytes within primary and metastatic colorectal cancer tumors. **Cancer Research**, v. 82, n. 12\_Supplement, p. 3842–3842, 15 jun. 2022.

KUPPUSAMY, K.; RAJAN CRP-, A.; ROSE VARGHESE CRP-, G.; RAJAN LATHA CRP-, N.; KRISHNAN CRP-, N.; PATRA CRP-, D.; WARRIER CRP-, A.; BHUSHAN CRP-, S.; DIVAKARAN NAIR, N.; SRINIVAS, P.; ARTICLE, R. Pathological and Molecular Analysis of Spontaneous Canine Mammary Carcinomas and its Prognostic implications. 2023.

KWON, J. Y.; MOSKWA, N.; KANG, W.; FAN, T. M.; LEE, C. **Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor** *Journal of Breast Cancer* Korean Breast Cancer Society, , 1 fev. 2023.

LABANI-MOTLAGH, A.; ASHJA-MAHDAVI, M.; LOSKOG, A. **The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 15 maio 2020.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology - Armed Forces Institute of Pathology (U.S.)**. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=R1xrAAAAMAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=PROPHET,et+al.,+1992&ots=oTv-WGnYin&sig=T-vErFJX4NoXUzCGInkEA4EmPUU#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 5 out. 2024.

LAKSHMI NARENDRA, B.; ESHVENDAR REDDY, K.; SHANTIKUMAR, S.; RAMAKRISHNA, S. Immune system: A double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**, v. 62, n. 9, p. 823–834, 19 set. 2013.

LI, J. J.; TSANG, J. Y.; TSE, G. M. **Tumor microenvironment in breast cancer—Updates on therapeutic implications and pathologic assessment** *Cancers* MDPI, , 2 ago. 2021.

LIN, W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer Find the latest version : Review series A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. v. 117, n. 5, p. 1175–1183, 2007.

LINDAHL, U.; COUCHMAN, J.; KIMATA, K.; ESKO, J. D. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. **Essentials of Glycobiology**, 7 set. 2017.

LOI, S. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: A pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 7, p. 559–569, 2019.

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

MANJILI, M. H.; ARNOUK, H.; KNUTSON, K. L.; KMIĘCIAK, M.; DISIS, M. L.; SUBJECK, J. R.; KAZIM, A. L. Emergence of immune escape variant of mammary tumors that has distinct proteomic profile and a reduced ability to induce “danger signals.” **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 96, n. 3, p. 233–241, 7 abr. 2006.

MATKOWSKI, R.; GISTEREK, I.; HALON, A.; LACKO, A.; SZEWCZYK, K.; STASZEK, U.; PUDELKO, M.; SZYNGLAREWICZ, B.; SZELACHOWSKA, J.;

ZOLNIEREK, A.; KORNAFEL, J. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. **Anticancer Research**, v. 29, n. 7, p. 2445–2451, 2009.

MATSUMOTO, K.; SHIONYU, M.; GO, M.; SHIMIZU, K.; SHINOMURA, T.; KIMATA, K.; WATANABE, H. Distinct Interaction of Versican/PG-M with Hyaluronan and Link Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 41205–41212, 17 out. 2003.

MCCULLOCH, D. R.; NELSON, C. M.; DIXON, L. J.; SILVER, D. L.; WYLIE, J. D.; LINDNER, V.; SASAKI, T.; COOLEY, M. A.; ARGRAVES, W. S.; APTE, S. S. ADAMTS Metalloproteases Generate Active Versican Fragments that Regulate Interdigital Web Regression. *Developmental Cell*, v. 17, n. 5, p. 687–698, 17 nov. 2009.

MENJIVAR, R. E. *et al.* Arginase 1 is a key driver of immune suppression in pancreatic cancer Editor's evaluation. v. 12, p. 80721, 2023.

MERVE EKICI, Z.; OZGUR OZYIGIT, M.; NAK, D.; AVCI KUPELI, Z.; ECEM KURUOGLU, F.; KOCA, D.; AVCILAR, T.; GUMUS, O.; NAK, Y. **The role of the systemic inflammatory response in canine mammary tumors.** [s.l: s.n.].

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMÉN, E. Definitions and explanatory notes. In: \_\_\_\_\_. *Who Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat.* **livro**, p. 19–27, 1999.

MIYAN, M.; SCHMIDT-MENDE, J.; KIESSLING, R.; POSCHKE, I.; BONIFACE, J. Differential tumor infiltration by T-cells characterizes intrinsic molecular subtypes in breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, 29 jul. 2016.

MUNN, L. Cancer and Inflammation. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.**, v. 9, n. 2, p. 139–148, 2017.

MUÑOZ-PRIETO, A.; CERÓN, J. J.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; MRLJAK, V.; TVARIJONAVICIUTE, A. **A Systematic Review and Meta-Analysis of Serum Adiponectin Measurements in the Framework of Dog Obesity.** *Animals* 2020, Vol. 10, Page 1650, v. 10, n. 9, p. 1650, 14 set. 2020.

MURTA, E. F. C.; ANDRADE, J. M. DE; FALCAO, R. P.; BIGHETTI, S. Lymphocyte Subpopulations in Patients with Advanced Breast Cancer Submitted to Neoadjuvant Chemotherapy. <https://doi.org/10.1177/030089160008600507>, v. 86, n. 5, p. 403–407, 1 set. 2000.

NABA, A.; CLAUSER, K. R.; LAMAR, J. M.; CARR, S. A.; HYNES, R. O. Extracellular matrix signatures of human mammary carcinoma identify novel metastasis promoters. **eLife**, v. 2014, n. 3, 11 mar. 2014.

NAKANO, O.; SATO, M.; NAITO, Y.; SUZUKI, K.; ORIKASA, S.; AIZAWA, M.; SUZUKI, Y.; SHINTAKU, I.; NAGURA, H.; OHTANI, H. **Proliferative Activity of Intratumoral CD8 T-Lymphocytes As a Prognostic Factor in Human Renal Cell Carcinoma: Clinicopathologic Demonstration of Antitumor Immunity** **CANCER RESEARCH**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/61/13/5132/2486392/5132.pdf>>.

NANDADASA, S.; FOULCER, S.; APTE, S. S. **The multiple, complex roles of versican and its proteolytic turnover by ADAMTS proteases during embryogenesis** **Matrix Biology** Elsevier, , 2014.

NEOPHYTOU, C. M.; PANAGI, M.; STYLIANOPOULOS, T.; PAPAGEORGIS, P. **cancers The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities**. 2021.

NUNES, F. C.; CAMPOS, C. B.; TEIXEIRA, S. V.; BERTAGNOLLI, A. C.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Epidemiological, clinical and pathological evaluation of overall survival in canines with mammary neoplasms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1714–1722, 1 nov. 2018.

OGIYA, R. *et al.* Comparison of tumor-infiltrating lymphocytes between primary and metastatic tumors in breast cancer patients. **Cancer Science**, v. 107, n. 12, p. 1730–1735, 2016.

OWEN, L. TNM Classification of tumours in domestic animals. **World Health Organisation**, p. 1–52, 1980.

PAPADAS, A.; ARAUZ, G.; CICALA, A.; WIESNER, J.; ASIMAKOPOULOS, F. **Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity** **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** SAGE Publications Ltd, , 1 dez. 2020.

PAPPAS, A. G.; MAGKOUTA, S.; PATERAS, I. S.; SKIANIS, I.; MOSCHOS, C.; VAZAKIDOU, M. E.; PSARRA, K.; GORGOULIS, V. G.; KALOMENIDIS, I. Versican modulates tumor-associated macrophage properties to stimulate mesothelioma growth. **Oncology**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2019.

PASTOR, N.; CABALLÉ, N. C.; SANTELLA, M.; EZQUERRA, L. J.; TARAZONA, R.; DURAN, E. Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. **Austral J Vet Sci**, v. 50, p. 143–147, 2018.

PINHO, S. S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C. A.; GÄRTNER, F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165–172, 1 mar. 2012.

PIOTROWSKI, I.; KULCENTY, K.; SUCHORSKA, W. **Interplay between inflammation and cancer** *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* Urban and Partner, , 1 maio 2020.

POPOVA, N. V.; JÜCKER, M. **The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer** *Cancers* MDPI, , 1 jan. 2022.

REDONDO-GARCÍA, S.; PERIS-TORRES, C.; CARACUEL-PERAMOS, R.; RODRÍGUEZ-MANZANEQUE, J. C. **ADAMTS proteases and the tumor immune microenvironment: Lessons from substrates and pathologies** *Matrix Biology Plus* Elsevier B.V., , 1 fev. 2021.

REIS, D. C. DOS *et al.* Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 3 jul. 2019.

REN, W. H.; ZHANG, X. R.; LI, W. B.; FENG, Q.; FENG, H. J.; TONG, Y.; RONG, H.; WANG, W.; ZHANG, D.; ZHANG, Z. Q.; TU, S. C. Circulating and tumor-infiltrating arginase 1-expressing cells in gastric adenocarcinoma patients were mainly immature and monocytic Myeloid-derived suppressor cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

RICCIARDELLI, C.; SAKKO, A. J.; WEEN, M. P.; RUSSELL, D. L.; HORSFALL, D. J. The biological role and regulation of versican levels in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1–2, p. 233–245, 22 jan. 2009.

RUFFELL, B.; AU, A.; RUGO, H. S.; ESSERMAN, L. J.; HWANG, E. S.; COUSSENS, L. M. Leukocyte composition of human breast cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. 2796–2801, 21 fev. 2012.

SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; DIAZ, D.; ROMERO, L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127381, 18 maio 2015.

SELLERI, S.; RUMIO, C.; SABATINO, M.; MARINCOLA, F. M.; WANG, E. Tumor Microenvironment and the Immune Response. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 737–753, 1 out. 2007.

SILVA, A. E. DA; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625–633, 2004.

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 3, p. 573–596, 2003.

SOSNOWSKA, A. *et al.* Inhibition of arginase modulates T-cell response in the tumor microenvironment of lung carcinoma. **OncoImmunology**, v. 10, n. 1, 2021.

SANTOS, J. S. S. **RELAÇÃO ENTRE AS VERSICANASES ADAMTS E MICROAMBIENTE INFLAMATÓRIO NO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES: ESTUDO EM MODELO DE CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1**. Salvador - Bahia: [s.n.].

SOUZA, C.M. **Potencial Biomarcador Da Proteólise De Versican No Câncer De Mama: Um Estudo Em Modelo Canino**. Fundação Oswaldo Cruz Instituto Gonçalo Moniz - Mestrado Salvador: [s.n.]. Salvador -Bahia, 2021

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. **Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer Pathobiology**. S. Karger AG, , 23 set. 2015.

TANG, M.; DIAO, J.; GU, H.; KHATRI, I.; ZHAO, J.; CATTRAL, M. S. Toll-like Receptor 2 Activation Promotes Tumor Dendritic Cell Dysfunction by Regulating IL-6 and IL-10 Receptor Signaling. **Cell Reports**, v. 13, n. 12, p. 2851–2864, 29 dez. 2015.

TIMMS, K. P.; MAURICE, S. B. **Context-dependent bioactivity of versican fragments**. **Glycobiology** Oxford University Press, , 1 jun. 2020.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, D. A. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 54, n. 1, p. 63–77, 31 mar. 2008.

TOSS, M. S.; MILIGY, I.; AL-KAWAZ, A.; ALSLEEM, M.; KHOUT, H.; RIDA, P. C.; ANEJA, R.; GREEN, A. R.; ELLIS, I. O.; RAKHA, E. A. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in ductal carcinoma in situ of the breast. **Modern Pathology**, v. 31, n. 8, p. 1226–1236, 1 ago. 2018.

VALENZA, C.; TAURELLI SALIMBENI, B.; SANTORO, C.; TRAPANI, D.; ANTONARELLI, G.; CURIGLIANO, G. **Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment**. **Cancers** MDPI, , 1 fev. 2023.

VGENOPOULOU, S.; LAZARIS, A. C.; MARKOPOULOS, C.; BOLTETSOU, E.; KYRIAKOU, V.; KAVANTZAS, N.; PATSOURIS, E.; DAVARIS, P. S. Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type. **Breast**, v. 12, n. 3, p. 172–178, 2003.

WIGHT, T. N.; KANG, I.; EVANKO, S. P.; HARTEN, I. A.; CHANG, M. Y.; PEARCE, O. M. T.; ALLEN, C. E.; FREVERT, C. W. **Versican—A Critical Extracellular Matrix Regulator of Immunity and Inflammation**. **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., , 24 mar. 2020.

WHO. Breast cancer.2020. Available online: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/breast-cancer> (accessed on 30 settembre 2024).

YANG, J.; XU, J.; YING, E.; SUN, T. Predictive and prognostic value of circulating blood lymphocyte subsets in metastatic breast cancer. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 2, p. 492–500, 1 fev. 2019.

YAZAKI, S. *et al.* Impact of adjuvant chemotherapy and radiotherapy on tumour-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in metastatic breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 128, n. 4, p. 568–575, 16 fev. 2023.

YEE, A. J.; AKENS, M.; YANG, B. L.; FINKELSTEIN, J.; ZHENG, P.-S.; DENG, Z.; YANG, B. The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. **Breast Cancer Research 2007 9:4**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 27 jul. 2007.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
 ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
 Hospital de Medicina Veterinária Prof. Renato Medeiros Neto

#### **Termo de esclarecimento/consentimento livre e esclarecido**

O presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tem o objetivo de informar ao responsável pelo paciente, quanto aos principais aspectos relacionados ao projeto ao qual o animal será submetido, complementando as informações prestadas pelo seu médico veterinário e pela equipe de profissionais do Projeto Mama do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

#### **Propósito e objetivo do projeto**

Tumores de mama em cadelas são os principais tumores observados na clínica de pequenos animais, sendo a taxa de malignidade extremamente variável, podendo alcançar mais de 90% dos casos, muitos dos quais já apresentam metástase linfática no momento do diagnóstico. A partir deste estudo clínico, objetivamos determinar os principais achados clínicos e conduta cirúrgica adequada; estabelecer o diagnóstico e graduação histopatológica das neoplasias, correlacionando com os fatores prognósticos; avaliar o potencial proliferativo dos tumores e a eficácia da cirurgia e quimioterapia (convencional e metronômica) no aumento da sobrevida global.

#### **Como eu faço para participar do projeto?**

Todos os pacientes deverão ser avaliados previamente pelos médicos veterinários responsáveis pelo estudo e esta avaliação deverá ser realizada no Hospital de Medicina Veterinária da UFBA. Para participação do projeto o proprietário deve ser comprometido em realizar todo o tratamento recomendado, além de estar ciente dos custos que terão com o tratamento.

#### **Quais são os exames necessários para inclusão do paciente no estudo?**

Após a avaliação inicial, o paciente será encaminhado para radiografia de tórax em 3 incidências, USG, eletrocardiograma e ecocardiograma a serem realizadas em clínica indicada pelos médicos veterinários responsáveis pelo projeto. Após este procedimento, serão coletadas amostras de sangue destes pacientes para realização de função hepática (ALT, FA), função renal (ureia e creatinina), hemograma completo, cálcio e glicose.

Após os exames pré-operatórios será realizada a cirurgia (mastectomia unilateral total com castração), a paciente ficará com bandagem compressiva durante 15 dias no pós-operatório. Após este período será realizada a retirada dos pontos. É de caráter obrigatório para a permanência no projeto a realização da análise histopatológica (biópsia) da cadeia mamária retirada. O resultado do histopatológico será avaliado por um dos médicos veterinários do projeto, o qual irá avaliar critérios de malignidade e este então irá indicar ou não o tratamento quimioterápico para a paciente. A quimioterapia convencional será realizada no total de 6 sessões, com intervalo de 21 dias, sendo necessário exames de sangue entre as sessões e o acompanhamento do paciente. Em casos de tumores de alto grau ou pacientes com metástase a distância estes farão também a quimioterapia metronômica, que é uma medicação administrada por via oral todos os dias.

**Quais são os efeitos colaterais que meu animal poderá apresentar durante o tratamento?**

O seu animal pode apresentar efeitos colaterais devido a quimioterapia convencional, podendo ser leves a sérios. Os efeitos colaterais mais comumente esperados são alterações gastrointestinais (vômito, diarreia e diminuição de apetite), trombocitopenia, leucopenia e anemia, que serão avaliados e então analisada a necessidade da interrupção do tratamento. Com relação a quimioterapia metronômica o efeito colateral mais comum é a cistite hemorrágica estéril, a qual é prevenida com o uso da medicação sempre pela manhã, aumento da ingestão de água e aumento da micção.

**Qual será o custo do tratamento?**

Exames de imagem (radiografia de tórax, USG, ECG E ECO)

Hemograma e bioquímica sérica

Cirurgia = de acordo com o tipo e peso do animal

Medicações pós-operatórias e quimioterápicas

**O que acontecerá em caso de desistência de participação?**

Você tem todo o direito de não autorizar e em qualquer momento da pesquisa interromper sua participação, devendo avisar o pesquisador com antecedência da sua desistência.

**Nome dos Médicos Veterinários responsáveis pelo estudo:**

Prof. Dra. Alessandra Estrela da Silva Lima (Coordenadora), MV. Msc. Laís Pereira Silva, MV. Msc. Marília Carneiro de Araújo Machado, MV. Msc. Carlos Humberto da Costa Vieira Filho, MV. Msc. Vitor de Moraes Pina de Carvalho, MV. Msc. Marcela Próspero Rodrigues Pinto, MV. Msc. Thanielle Novaes Fontes, MV. Msc. Viviane Abreu, MV. Dra. Karine Araújo Damasceno e MV. Simone Nunes

**Em caso de duvidas entrar em contato com:**

Celular: (71) 99171-0841 / E-mail: aestrela@ufba.br – Profa. Alessandra Estrela Lima

**Anexo 2: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

**Universidade Federal da Bahia**  
**Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia**  
**Comitê de Ética no Uso de Animais**  
 Av. Ademar de Barros, 500 – Ondina-40170-110 Salvador-BA  
 (071) 3283-6701/6702/6718  
[ceua.ufba@ufba.br](mailto:ceua.ufba@ufba.br)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada **“TUMORES MAMÁRIOS CANINOS: RELAÇÃO DA VERSIKINA, PERFIL LINFOCÍTICO E EVASÃO IMUNE NO MICROAMBIENTE TUMORAL”**, registrada com o nº **16/2021**, sob a responsabilidade da **pesquisadora ALESSANDRA ESTRELA DA SILVA LIMA**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, **em reunião de 21.06.2021**.

Finalidade	( )Ensino (X) Pesquisa ( )Extensão
Vigência da autorização	01/08/2021 à 01/07/2023
Espécie/linhagem/raça	Canis lupus familiaris (cão)
Nº de animais	60
Peso/Idade	2-60 kg / 2-18 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Atendimento na rotina do Hospital de Medicina Veterinária da UFBA por profissionais do Núcleo de Pesquisa em Oncologia Mamária (NPqOM)

Salvador, 15/07/2021

**LÚCIO LEOPOLDO ARAGÃO DA SILVA**  
 Coordenador CEUA/MEVZ

**Anexo 3:** Ficha para exame clínico de pacientes com tumores mamários caninos

**FICHA CLÍNICA DE ACOMPANHAMENTO DE CADELAS COM NEOPLASIAS  
MAMÁRIAS**

RG: \_\_\_\_\_ RG projeto: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Histo: \_\_\_\_\_ Cito: \_\_\_\_\_ Raio-X: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Espécie: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo:  Macho  Fêmea Pelagem: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Porte:  Pequeno (até 35cm) Peso: \_\_\_\_\_

FC: \_\_\_\_\_ FR: \_\_\_\_\_  Médio (36-46cm) Condição corporal:  Magro

Mucosas: \_\_\_\_\_ TPC: \_\_\_\_\_  Grande (acima 46cm)  Normal

Alimentação:  Ração  Comida caseira  Ração + Comida caseira  Obeso

Ambiente: \_\_\_\_\_

Antecedentes genéticos: \_\_\_\_\_

Vacinação: Anti-rábica  Sim  Não Quando/Qual: \_\_\_\_\_

Outras  Sim  Não Quando/Qual: \_\_\_\_\_

Vermifugação:  Sim  Não Quando/Qual: \_\_\_\_\_

Doenças anteriores e atuais: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tomando medicamento:  Sim  Não Qual/Tempo: \_\_\_\_\_

Anticoncepcional:  Sim  Não Quanto/Qual: \_\_\_\_\_ Última data: \_\_\_\_\_

Cio Regular:  Sim  Não Último (data): \_\_\_\_\_

Castrada:  Sim  Não Idade: \_\_\_\_\_

Pseudo-gestação:  Regulares  Intermitentes  Não

Partos:  Sim  Não Quantos: \_\_\_\_\_ Último: \_\_\_\_\_

Aborto:  Sim  Não Quantos: \_\_\_\_\_ Último: \_\_\_\_\_

Já cruzou e não emprenhou:  Sim  Não

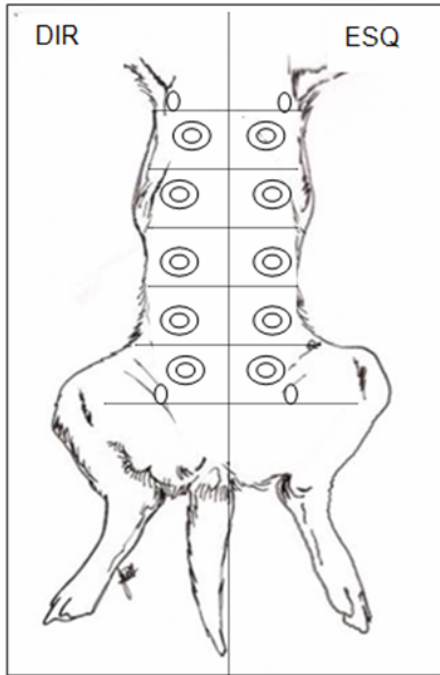
Secreção vaginal:  Sim  Não Quando/Intensidade: \_\_\_\_\_

Características do(s) tumor(s):

Integra  Ulcerada  Cística

Mamas acometidas: (Esquema)

Exames solicitados:.....



Marcar com um X o tamanho correspondente:

M1D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M1E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M2D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M2E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M3D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M3E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M4D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M4E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M5D - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

M5E - <= 3cm  ; >3-5cm  ; >5cm

Outro local: .....

Consistência: .....

Secreção: Sim  Não  .....

Edema de membros: Sim  Qual(is)? ..... Não

Linfonodos infartados: Sim  Qual(is)? ..... Não

Veterinário resp: ..... Data: ...../...../.....