



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**RELAÇÃO ENTRE VERSICANASE E MATRIKINA COM O
REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR: ESTUDO
EM MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO
TRIPLO NEGATIVO 4T1**

SALVADOR – BA

2023

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**RELAÇÃO ENTRE VERSICANASE E MATRIKINA COM O REMODELAMENTO
DA MATRIZ EXTRACELULAR: ESTUDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dra. Karine Araújo Damasceno

SALVADOR – BA

2023

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA ARAUJO

**RELAÇÃO ENTRE VERSICANASE E MATRIKINA COM O REMODELAMENTO
DA MATRIZ EXTRACELULAR: ESTUDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO 4T1**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 11 de novembro de 2023.



Msc. Julia Souza Soledade Santos
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Bahia



Prof. Dr. Cinthia Vilanova Santana
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Valdenizia Rodrigues
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, especialmente aos meus pais, João e Neide, minha irmã, Maria Claudia, meus avós, Vanda e Pedro, e minha prima Fernanda, por me encherem de amor e apoio e por serem o meu porto seguro durante toda a minha vida. Foi tudo por vocês e para orgulhá-los.

Ao meu amor, Matheus, por estar ao meu lado em todos os momentos desde que entrou em minha vida, me apoiando e me ensinando a confiar em mim e no meu potencial, e por fazer a diferença nos meus dias.

Aos meus amigos, minha família que o salesiano me deu, por sempre me motivarem, vibrarem por mim, e por todos os momentos juntos, que trouxeram leveza aos meus dias.

Ao meu G5 e Fofocalizando, por todos os momentos de risadas e desesperos em conjunto durante a faculdade. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

À minha orientadora, Karine, pela orientação excepcional, baseada em paciência, ensinamentos, cuidado e confiança. Por ter me ensinado mais do que apenas o esperado em uma orientação, por ter acreditado em mim, e me dado a oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço à minha mestranda Júlia, que merece um espaço especial, por todo apoio, por todo cuidado e paciência durante o meu período de iniciação científica. Sem você nada seria possível.

Gratidão aos professores da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública que me ajudaram a crescer como pessoa e como profissional, por terem me mostrado a beleza da biomedicina e por terem ensinado todos os pilares importantes para seguir a minha vida profissional.

Ao GOC, o grupo que me acolheu de braços abertos e que me trouxe muito mais do que ensinamentos teóricos e práticos, que me trouxe amizades lindas e que me proporcionou momentos de parceria e diversão. Obrigada Ana, Simone, Júlia, Lorena, Bruno, Laiane, Ágata, Stephanie e Esther.

Por fim, agradeço à Fiocruz, ao Programa de Iniciação Científica e à FAPESB pela concessão da bolsa de estudos e suporte durante esse período.

“Muitos afirmam que tudo o que sabemos ainda é infinitamente menos do que tudo o que ainda permanece desconhecido”

- William Harvey

SUMÁRIO

1. ARTIGO CIENTÍFICO	7
1.1 RESUMO	8
1.2 ABSTRACT	9
1.3 INTRODUÇÃO	10
1.4 MÉTODOS	13
1.5 RESULTADOS	17
1.6 DISCUSSÃO	21
1.7 CONCLUSÃO	24
1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
1.9 TABELAS	30
1.10 GRÁFICOS	33
1.11 FIGURAS	35
2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO	45
2.1 REVISTA: CLINICAL ONCOLOGY LETTERS	45
2.2 REGRAS PARA SUBMISSÃO:	45

1. ARTIGO CIENTÍFICO

Relação entre Versicanase e Matriquina com o Remodelamento da Matriz Extracelular: Estudo em Modelo Experimental de Carcinoma Mamário Triplo Negativo 4T1

Relationship between Versicanase and Matrikine with the Remodeling of the Extracellular Matrix: Study in an Experimental Model of Triple Negative Mammary Carcinoma 4T1

Câncer de Mama 4T1 e Remodelamento de Matriz

Maria Eduarda de Oliveira Araujo^{1,2}, Júlia Souza Soledade Santos², Simone Nunes², Alessandra Estrela Lima³, Daniel Pereira Bezerra^{2,4}, Diego dos Reis², Thiago Marconi², Karine Araujo Damasceno²

¹ Graduação em Biomedicina, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil

² Instituto Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil

³ Laboratório de Patologia Laboratório de Patologia Veterinária, HOSPMEV, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

⁴ Integrated Pathology Unit, The Institute of Cancer Research (ICR), Londres, Reino Unido

*Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES); Edital INOVA – Geração de Conhecimento, Fiocruz

*Autor Correspondente: Karine Araújo Damasceno, Laboratório de Patologia Experimental, Instituto Gonçalo Moniz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710, Salvador, Bahia, Brasil; Email: karine.damasceno@fiocruz.br

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a relação entre a versicanase ADAMTS 15, versikina e o microambiente tumoral em modelo murino 4T1. **MÉTODOS:** Foram realizadas análises histomorfológicas em amostras de tumores, linfonodos e pulmões nos grupos de 7, 14, 21 e 28 dias de crescimento tumoral, análises da expressão imunohistoquímica de versican, versikina e ADAMTS 15, bem como avaliação da distribuição de colágeno na matriz extracelular peritumoral. **RESULTADOS:** O estudo teve como achados o surgimento de metástases espontâneas em pulmão a partir dos 21 dias, aliado a uma expressão progressiva de versican, versikina e ADAMTS 15 ao longo da progressão tumoral, em que as maiores expressões de versican em estroma e células tumorais foram aos 21 e 28 dias, e de versikina e ADAMTS 15, em estroma, aos 21 dias. Além disso, houve um aumento da deposição dos diferentes tipos de colágeno, sendo o colágeno III predominante em relação ao colágeno I, e foi observada uma correlação negativa entre a expressão de versican e ADAMTS 15 com a deposição de colágeno no grupo de 28 dias em estroma e em tumor. **CONCLUSÃO:** Nota-se uma relação entre esses componentes da matriz extracelular e o desenvolvimento do tumor de mama, ao ponto que sua remodelação pode ser um mecanismo pelo qual as células tumorais controlam o microambiente para facilitar sua progressão e o desenvolvimento de metástases.

Palavras-chave: Câncer de Mama Triplo Negativo; ADAMTS; Matriz Extracelular.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the relationship between versicanase ADAMTS 15, versikin and the tumor microenvironment in a 4T1 murine model. **METHODS:** Histomorphological analysis of tumor, lymph node and lung samples from the 7-, 14-, 21- and 28-day tumor growth groups, analysis of the immunohistochemical expression of versican, versikin and ADAMTS 15, as well as evaluation of the distribution of collagen in the peritumoral extracellular matrix were performed. **RESULTS:** The study found the appearance of spontaneous metastases in the lung at 21 days, accompanied by progressive expression of versican, versikin and ADAMTS 15 throughout tumor progression, with the highest expressions of versican in the stroma and tumor cells at 21 and 28 days, and of versikin and ADAMTS 15 in the stroma at 21 days. In addition, there was an increase in the deposition of the different types of collagen, with collagen III predominating over collagen I, and a negative correlation was observed between the expression of versican and ADAMTS 15 and collagen deposition in the stroma and tumor in the 28-day group. **CONCLUSION:** It is evident a relationship between these extracellular matrix components and breast tumor development, so that the remodeling may be a mechanism by which tumor cells control the microenvironment to facilitate their progression and the development of metastases.

Keywords: Triple Negative Breast Cancer; ADAMTS; Extracellular Matrix.

INTRODUÇÃO

Em mulheres, o câncer de mama é a doença neoplásica mais incidente no mundo e a primeira causa de morte por câncer no Brasil. Esse tipo de tumor continua sendo um importante foco de estudo, devido ao elevado número de novos casos estimados, cerca de 73.610 casos para o ano de 2023^{27,16}.

O carcinoma mamário configura-se como uma neoplasia complexa e heterogênea que apresenta diversos subtipos associados a aspectos moleculares, sendo eles: luminal A, luminal B, superexpressão de HER-2 e triplo negativos. O subtipo triplo negativo é caracterizado pela ausência de receptores de estrógeno, receptores de progesterona e HER2, representando o pior prognóstico devido à maior agressividade, às maiores taxas de recidiva e à falta de terapias específicas, em comparação com os demais^{1,5,19}.

Atualmente, tem sido reconhecido pela literatura científica que o microambiente tumoral é um fator chave em diversos aspectos, desde o desenvolvimento neoplásico, a resposta à imunoterapia e ao prognóstico do paciente, especialmente no câncer de mama triplo negativo^{1,20}. Esse microambiente consiste em um ecossistema envolta dos tumores e das células tumorais, composto pelas próprias células tumorais, células endoteliais, células imunes, fibroblastos associados ao câncer (CAFs), perícitos, adipócitos, fatores de crescimento, citocinas, metaloproteases, e por uma matriz extracelular (MEC)^{30,24}. A MEC tem composição única em cada órgão/tecido, apresentando como função básica a sustentação tecidual e regulação de funções celulares de migração, proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência, mediadas pela sua remodelação⁴.

Na tumorigênese, as células cancerígenas são capazes de induzir as proteínas de matriz a promover a progressão tumoral e organização do nicho metastático através da desregulação do remodelamento da MEC por enzimas proteolíticas¹. Com isso, são observadas alterações na composição da matriz como: cross-linking de colágeno I, promovendo aumento da rigidez, recrutamento e ativação de fibroblastos em CAFs (fibroblastos associados ao câncer), transição

epitelial-mesenquimal, favorecendo a migração e invasão, estímulo da angiogênese e evasão imune²⁰. Esse processo pode ocorrer por diferentes famílias de proteases, como as ADAMTSs (metaloprotease-desintegrinas com motivo de trombospondina I), metaloproteases que têm sido constantemente estudadas acerca da sua relação com o câncer^{4,20}.

A ADAMTS 15 é uma importante metaloprotease envolvida nesse processo de remodelamento, contudo ainda não tem seu papel elucidado no desenvolvimento do câncer de mama. Essa enzima apresenta uma atividade antiangiogênica e de redução da migração celular, porém, estes efeitos são independentes da sua atividade como metaloproteinase^{4,17}. Estudos anteriores, realizados em linhagens de carcinoma mamário MDA-MB-231 e MCF-7, apontaram seus múltiplos efeitos no desenvolvimento de tumores mamários, tanto pró- quanto anti tumorais¹⁸.

Um dos principais substratos dessa metaloprotease é o Versican (VCAN), proteoglicano hialectano presente na matriz extracelular que está envolvido em diversas etapas da sua remodelação, como a adesão, proliferação, migração celular e angiogênese³. Por isto, esta e outras enzimas da família ADAMTS são chamadas de versicanases. A clivagem desse proteoglicano em regiões específicas das isoformas V0 e V1, gera um fragmento bioativo com característica de matriquina, ou seja, associado a infiltração de células imunes, denominado de versikina (VKINA)²². Enquanto o VCAN tem sido apontado em estudos com uma atividade tolerogênica em tumores, há hipóteses de que a VKINA apresenta uma ação antagonica, sendo um possível alvo de estratégias antitumorais, porém, essa correlação inversa não é observada em todos os tipos tumores e microambientes²².

Embora o VCAN seja considerado um relevante componente da MEC no câncer de mama em humanos e animais, a influência da sua proteólise, mais especificamente a função de um dos seus fragmentos bioativos, a versikina, na remodelação da MEC e no processo tumoral ainda é pouco elucidado⁹. Nessa perspectiva, esse tipo de estudo possibilita o entendimento dos mecanismos do câncer de mama influenciados pelo microambiente, como sua própria

progressão e o desenvolvimento de metástases, assim como a análise de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos. Sendo assim, esse estudo investigou a ação da protease ADAMTS 15, e da VKINA e suas relações com o remodelamento da matriz extracelular em diferentes etapas da progressão do tumor mamário no modelo murino 4T1. Este modelo é reconhecidamente válido por mimetizar aspectos do câncer humano, inclusive em aspectos de progressão do tumor e desenvolvimento de metástases espontâneas, o que permite o monitoramento das alterações, a avaliação das correlações e a identificação dos papéis das moléculas estudadas no desenvolvimento do tumor^{26,7}.

MÉTODOS

Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de cunho experimental, realizado com camundongos da espécie Balb/c inoculados com células tumorais, com o intuito de avaliar a relação entre componentes da matriz extracelular e a progressão do tumor mamário murino 4T1.

Aspectos Éticos

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

Modelo Singênico 4T1 e Coleta de Amostras

A linhagem de células de carcinoma mamário murino 4T1 foi mantida em meio DMEN F12 suplementado com 10% de FBS, penicilina a 100µg/mL e estreptomicina a 100µg/mL, à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

O protocolo experimental foi baseado na utilização de 36 camundongos BALB/c fêmeas a partir dos 45 dias de idade, os quais foram divididos em 1 grupo controle, sem inóculo de células tumorais (n=4), e 4 grupos teste (n=8), com inóculo de células tumorais 4T1.

Inicialmente, os animais dos 4 grupos teste foram inoculados com células tumorais 4T1 (2 milhões de células em 100 uL) heterotopicamente na região subcutânea do flanco direito. Após a inoculação, o crescimento do tumor e o peso do animal foram mensurados a cada 48 horas. O volume do tumor foi calculado pela fórmula: volume do tumor (mm³) = (comprimento x largura)² / 2¹⁰.

Aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação, foi realizada a eutanásia com anestésico (cetamina + xilasina 833 mg / kg via intraperitoneal). Tumores e pulmão foram dissecados, pesados e processados para análises histopatológicas e imuno-histoquímicas. Além disso, outros tecidos como linfonodos, baço, fígado, coração e rins também foram coletados e

processados para confirmar metástase em exame histopatológico com a coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E).

Processamento e Análise Histopatológica

Após cada eutanásia, os fragmentos de tumor, pulmão e outros órgãos foram fixados em solução formalina neutra tamponada com fosfato a 10% no período de 24 horas e em seguida processados e incluídos em parafina. Para avaliar o remodelamento da matriz, cortes histológicos seriados de 4 µm foram obtidos e corados H&E, Tricrômico de Masson (TM) e Picro-sírius (PS) e analisados em microscópio de luz Olympus BX-40.

Crítérios de Avaliação das Colorações Especiais

Foram realizadas colorações especiais de tricrômico de masson e picrossírius para análise e caracterização das fibras de colágeno. A coloração por picrossírius possibilita uma avaliação morfométrica quantitativa dos feixes de colágeno. Sob luz polarizada foi possível caracterizar o colágeno em tipo I e III conforme a birrefringência em vermelho-amarelado ou verde, respectivamente². O tricrômico de masson foi utilizado para analisar a quantidade e distribuição de colágeno e de outros componentes da matriz⁸.

As análises de picrossírius e de tricrômico foram realizadas em fotomicrografias obtidas em 10 campos histológicos, na objetiva de 20x, utilizando a câmera digital do microscópio LEICA LMD 6500, software de captura LAS® versão 4.5. A quantificação dos pixels obtidos nas micrografias foi realizada a partir do método semiautomático padronizado no nosso laboratório (Laboratório de Patologia Experimental – LAPEX) utilizando o software ImageJ®, versão Fiji (ferramenta Versatile), através do qual é possível determinar a área (µm) ocupada pelas fibras, assim como sua intensidade de coloração.

Análise de Metástases

Foi realizada a contagem do número de nódulos metastáticos em lâminas coradas em HE, na objetiva de 100x e 400x, em três fragmentos de cada lóbulo pulmonar esquerdo.

Foram considerados nódulos metastáticos pulmonares, qualquer agrupamento de células neoplásicas distribuído por todo parênquima pulmonar, pleura, brônquios e bronquíolos. Células neoplásicas isoladas ou êmbolos de células neoplásicas dentro de vasos não foram consideradas como metástases.

Análise Imuno-Histoquímica

Para esta técnica, secções de 4µm obtidas de cada caso foram colocadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas passaram por um processo de desparafinização e reidratação através de uma sequência de passagens em xilol e em álcoois progressivamente diluídos (absoluto, 90% e 80%). Posteriormente, essas lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em calor úmido com tampão citrato pH 6 ou por reação enzimática com condroitinase. Em seguida, incubadas com peróxido de hidrogênio 3% durante 4 ciclos de 10min para o bloqueio da peroxidase endógena e posteriormente, com Protein Block (Novolink™ Max Polymer Detection System) por 30min para o bloqueio da proteína. Após bloquear possíveis reações cruzadas, os cortes foram então incubados com os respectivos anticorpos primários (anti-versican, anti-VKINA e anti-ADAMTS15) por 1 hora à 25°C ou overnight à 4°C. Na sequência foi aplicado o anticorpo secundário por 30min e, posteriormente, o polímero (Novolink™ Max Polymer Detection System) por 30min. Por fim, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's (Tabela 1).

As lâminas controles passaram pelas mesmas etapas, havendo substituição apenas na etapa do anticorpo primário, o qual foi substituído por soro normal.

Crítérios de Avaliação dos Marcadores Imuno-Histoquímicos

Os critérios para a marcação da expressão dos marcadores foram baseados no sistema de score avaliado por Skandalis et al., 2011. Esse sistema é baseado em uma avaliação

semiquantitativa do estroma e das células tumorais, o qual inclui a porcentagem total do tecido marcado pela molécula e a intensidade da marcação da mesma, considerada (1) como negativo ou fracamente marcado, (2) positivo fraco, (3) positivo moderado e (4) como positivo forte.

Sendo assim, o grau de expressão dos marcadores foi dado pela multiplicação da porcentagem de tecido marcado (0 - 100%) pela intensidade de marcação (1 - 4).

Análise Estatística

Os resultados quantitativos obtidos que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade, seguido de teste de médias. Para relacionar as variáveis, foi utilizado o Teste T para os dados paramétricos e o Kruskal Wallis para os dados não paramétricos. Para as análises de correlação, foram realizados os testes de Spearman e de Regressão Linear.

As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Graphpad InStat v. 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA), sendo consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste obteve valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Caracterização do Tumor 4T1

Posterior à inoculação das células tumorais 4T1, todos os camundongos foram acompanhados e avaliados a cada 48h para observar a progressão do carcinoma mamário. Nessa perspectiva, durante o experimento houve um aumento progressivo no peso desses animais, visto no Gráfico 1, sendo maior no grupo controle.

Em relação à evolução tumoral, no período dos 28 dias de experimento, foi realizada a avaliação do volume do tumor e, no dia da eutanásia de cada grupo, do peso do tumor de cada animal. Nessas análises, foi observado um evidente aumento tanto no tamanho do tumor no decorrer dos 28 dias, quanto no seu peso, sendo ambos maiores no grupo de 28 dias (Grupo D), como ilustrado na Figura 1 e no Gráfico 02, respectivamente.

Análise Histopatológica

Os tumores foram analisados histopatologicamente no sítio primário e metastático através da coloração de hematoxilina e eosina (H&E), para quantificação da necrose, ulceração, metástase em linfonodo e em pulmão.

Na análise macroscópica realizada no decorrer do experimento, foi observada a presença de ulceração e aderência ao tecido cutâneo a partir dos 14 dias, na maioria dos camundongos. Quanto aos critérios histopatológicos, 23 camundongos apresentaram necrose tumoral, sendo observada a partir dos 14 dias, e 10 apresentaram metástase pulmonar, iniciando aos 21 dias. Além disso, dos animais em que a coleta dos linfonodos inguinais foi possível, 9 apresentaram metástase, informações que podem ser visualizadas na Tabela 02.

Na pesquisa de metástase em parênquima pulmonar, foram observados focos metastáticos em alguns animais dos grupos de 21 e 28 dias, os quais podem ser observados na Figura 2, onde são representadas fotomicrografias de pulmão na coloração de hematoxilina e eosina.

Caracterização Morfológica de Colágeno na Matriz Extracelular Tumoral

Para caracterização morfológica de colágeno na matriz, foram utilizadas as colorações especiais de tricrômico de masson (coloração azulada) e picrossírius red (coloração esverdeada-avermelhada), cujos padrões das fibras de colágeno foram avaliados nas áreas adjacentes à proliferação epitelial do tumor de cada caso.

Nas análises de tricrômico de masson, foram revelados valores de média de remodelamento de colágeno semelhantes nos 14, 21 e 28 dias no tumor. A coloração de picrossírius, por sua vez, revelou uma predominância de colágeno do tipo III em todos os grupos em comparação ao colágeno do tipo I, entretanto, os dois tipos de colágeno apresentaram um aumento gradativo no decorrer da progressão do tumor primário. Dados demonstrados na tabela 3. A disposição dessas fibras de colágeno, em ambas as colorações utilizadas podem ser observadas na Figura 3.

Expressão de Versican, Versikina e ADAMTS 15 em Estroma Peritumoral e Células Murinas 4T1

Para avaliar a degradação enzimática, os marcadores Versican, Versikina e ADAMTS 15 tiveram sua expressão avaliada em estroma peritumoral e nas células tumorais nos grupos de 14, 21 e 28 dias de crescimento tumoral.

Análise da expressão de VCAN em estroma e células neoplásicas

O proteoglicano versican apresentou maior expressão no estroma peritumoral nos grupos de 21 e 28 dias quando comparado aos tumores do grupo de 14 dias, com diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0119$ e $p = 0,0257$). A sua expressão em células tumorais 4T1, por sua vez, foi maior observada no grupo de 28 dias em comparação ao grupo de 14 dias ($p = 0,0042$).

Também foi observada uma diferença estatística na avaliação do escore final de expressão de VCAN nas células tumorais, o qual foi maior no grupo de 28 dias em comparação ao grupo de 14 dias ($p = 0,0323$). A imunomarcção de VCAN em estroma e em célula 4T1 pode ser observada na Figura 4.

Análise da expressão de Versikina em estroma e células neoplásicas

O proteólito VKINA, por sua vez, apresentou um maior número de casos com altas intensidades de expressão (grau 3 e 4) nos grupos de 21 e 28 dias no estroma, contudo não foi observada uma diferença estatística significativa. Entretanto, na análise de escore final, houve maior expressão em estroma dessa molécula no grupo de 21 dias com diferença estatística ($p = 0,0193$) em comparação com o grupo de 14 dias. A imunomarcção de VKINA em estroma peritumoral e em células neoplásicas pode ser observada na Figura 5.

Análise da expressão de ADMTS15 em estroma e células neoplásicas

A análise de expressão estromal da versicanase AD15 demonstrou diferenças estatísticas significativas quanto a porcentagem, intensidade e escore final de expressão, ao comparar os grupos de 21 e 28 dias ($p = 0,0081$, $p = 0,0169$, $p = 0,0219$, respectivamente). A imunomarcção desta enzima pode ser observada na Figura 6.

As intensidades de expressão dos marcadores podem ser observadas na Figura 7.

Expressão de Versican, Versikina e ADAMTS 15 no Parênquima Pulmonar

A intensidade de expressão dos marcadores também foi avaliada nas amostras de pulmão, não sendo observadas diferenças estatísticas na expressão de Versikina e ADAMTS 15 em parênquima pulmonar, porém foram reveladas diferenças significativas entre os grupos na análise de expressão de Versican, sendo maior no grupo de 28 dias em comparação ao grupo de 7 dias ($p = 0,0039$).

A imunomarcagem das moléculas em pulmão nos diferentes tempos de avaliação, podem ser observadas nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

Correlação entre a Degradação Enzimática e o Remodelamento da Matriz Extracelular

No intuito de compreender a relação entre a expressão de ADAMTS15 e sua ação proteolítica na MEC, foi realizada a correlação entre a imunexpressão dos marcadores da degradação enzimática com a deposição de colágeno de matriz. A avaliação por tricrômico de masson, possibilitou a observação de uma correlação negativa entre a deposição de colágeno e a expressão de VCAN ($p = 0,0246$ e $r = -0,85$) e de ADAMTS 15 ($p = 0,0333$ e $r = -0,92$), nas células tumorais do grupo de 28 dias. Além disso, foi observada uma correlação inversa entre a deposição de colágeno tipo III e a expressão de VCAN em estroma, também no grupo de 28 dias ($p = 0,0008$ e $r = -0,99$). Esses dados podem ser observados na Figura 10.

DISCUSSÃO

A complexidade e heterogeneidade da neoplasia mamária, assim como sua crescente incidência, tornou necessária a implementação de modelos complementares de investigação, para auxiliar na descoberta de novas estratégias e para validação de novos alvos terapêuticos¹². Nesse aspecto, observa-se a viabilidade dos modelos murinos, os quais apresentam linhagens com características conhecidas e compartilham aspectos genéticos e fisiológicos com os humanos, o que os torna factíveis para o estudo de tumores²¹.

No contexto do câncer de mama triplo negativo, o modelo murino 4T1 tem sido amplamente utilizado por mimetizar aspectos da doença humana e por ser facilmente transplantável e pouco imunogênico^{14,26}. Esse modelo apresenta uma característica importante que é o crescimento progressivo do tumor no sítio primário, seguido da invasão local dos tecidos circundantes e a formação de metástases espontâneas no pulmão a partir da segunda semana, achados confirmados no presente trabalho, corroborando com estudos prévios de Dos Reis e colaboradores (2019) e Yang, Zhang e Huang (2013).

Considerando a invasividade e falta de responsividade do câncer de mama triplo negativo, não sendo sensível a terapias endócrinas e terapias moleculares direcionadas, visto seu fenótipo molecular, a análise do microambiente tumoral tem se tornado crucial para uma melhor compreensão da neoplasia^{1,11,30}. Dessa forma, no intuito de compreender essa complexa rede de interações, nesse estudo, foi avaliada a relação de diferentes componentes do microambiente com a progressão do tumor murino 4T1, e suas possíveis correlações.

No presente estudo, as análises imunohistoquímicas mostraram uma crescente expressão de VCAN em estroma peritumoral e em células tumorais, o que aponta uma associação desse marcador com a progressão do tumor, ao ponto que, suas maiores expressões foram observadas nos grupos de 21 e 28 dias, e foi observada uma regulação positiva entre a expressão desse proteoglicano e a formação de metástases em linfonodo e pulmão. Tais achados corroboram com estudos anteriores que apontam que níveis elevados desse proteoglicano estão

associados à invasão tumoral, angiogênese e formação de metástases, o que sugere sua contribuição para a agressividade e disseminação do câncer²².

A interação entre versican e as células neoplásicas influencia o desenvolvimento metastático. No entanto, no que diz respeito ao câncer de mama, o papel da proteólise de versican e seu proteólito, versikina, permanece pouco explorado, assim como suas relações com os outros componentes da matriz e o envolvimento com a progressão tumoral¹⁰.

No presente trabalho VKINA revelou um diferente perfil de expressão, uma vez que foi mais expressa no período de 21 dias, coincidindo com a semana de surgimento de metástases, seguida de um leve declínio no período de 28 dias. Tal resultado se assemelha à trabalhos anteriores que associam a proteólise de versican a um pior prognóstico, embora a bioatividade dos seus proteólitos, incluindo a versikina, tenha efeitos variáveis a depender do contexto, podendo ser intensificadores ou inibidores da patogênese^{22,28}. A matriquina já foi associada em estudos com a presença de um infiltrado de células T em outros tipos de câncer, incluindo câncer colorretal, além disso outras pesquisas associaram a VKINA com um ambiente pró tumoral e favorável à metastização^{15,22}.

Semelhante à versikina, ADAMTS 15 revelou maior expressão aos 21 dias de crescimento tumoral. Estudos anteriores demonstraram que a ADAMTS 15 apresenta múltiplas funções que influenciam na vascularização tumoral e nas interações das células neoplásicas com seu microambiente¹⁸. Um ensaio em camundongos imunocomprometidos, demonstrou que a ADAMTS 15 teve efeitos na colonização tecidual por células de carcinoma mamário, mas o efeito era dependente do órgão alvo, sendo observada redução de metástases em fígado e um aumento de metástase pulmonar em células que expressam a ADAMTS 15 cataliticamente ativa¹⁸.

A rede de colágenos age como uma barreira mecânica contra a migração e invasão de células neoplásicas. Porém, alterações na estrutura dessas fibras torna maior o risco de metástase, o que ocorre quando há maior deposição de colágenos I, III e IV¹³. Conforme os

resultados, foi observada uma maior deposição de colágeno tipo III em comparação com o colágeno tipo I. Sabe-se que o colágeno tipo III contribui para a elasticidade da MEC e mudanças na elasticidade ou rigidez tecidual influenciam na capacidade das células tumorais moverem-se e disseminarem-se²³. Isso pode indicar que, nesse modelo 4T1, a MEC sofre maior deposição de colágeno do tipo III, afetando a comunicação entre as células neoplásicas e seu entorno, o que favorece a proliferação, invasão e progressão tumoral.

Além disso, ambos os tipos de colágeno (I e III) foram relacionados de forma favorável à progressão tumoral visto que há um aumento crescente de deposição de colágeno ao longo do experimento, corroborando com os estudos de Dos Reis e colaboradores (2019). O aumento da deposição de colágeno I contribui, inclusive, para a alta densidade mamográfica, um fator de risco para agressividade no câncer de mama e pior prognóstico²³.

Nas análises de correlação, da coloração de tricrômico de masson e expressão imunohistoquímica, no tumor, os resultados mostraram correlações negativas entre colágeno, VCAN e ADAMTS 15. Isso indica uma relação inversa entre a enzima, o proteoglicano e a deposição de colágeno. Apesar da relação entre VCAN e colágeno ser pouco relatada, um estudo demonstrou o papel de versican como regulador favorável da fibrilogênese e da compactação de colágeno, mediada por células, *in vitro* e *in vivo*⁶. A relação inversa encontrada no presente trabalho, pode ser explicada pelo método de avaliação, uma vez que foi analisada aqui apenas a densitometria do colágeno. É válido ressaltar também que a organização estrutural do colágeno ainda não é completamente compreendida, diferentes organizações trazem diferentes cenários, seja de supressão ou de proliferação tumoral²³.

CONCLUSÃO

A crescente expressão de VCAN, VKINA e ADAMTS15 com o decorrer dos tempos de progressão do tumor, e a correlação inversa com deposição de colágeno, aponta para a dinâmica de remodelamento que a matriz extracelular sofre durante a progressão tumoral para facilitar a expansão do tumor, invasão das células no estroma e impulsionar a formação das metástases.

Tais resultados indicam que a remodelação da MEC, pode ser um mecanismo pelo qual as células tumorais controlam o microambiente para facilitar sua progressão e promover o desenvolvimento de metástases²⁵. Esses achados corroboram para a necessidade de maiores estudos acerca da relação entre os componentes de matriz extracelular e o desenvolvimento do câncer de mama, assim como do envolvimento dessas moléculas com a resposta imunológica, para avaliar possíveis correlações, visto que, estas moléculas podem se tornar novos biomarcadores e alvos terapêuticos, ou permitir a descoberta de outros potenciais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergamaschi A, Tagliabue E, Sorlie T, et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *The Journal Of Pathology*. 2008;214(3):357-367. Available from: <https://doi.org/10.1002/path.2278>
2. Bhutda S, Surve MV, Anil A, et al. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. *Bio-Protocol Journal*. 2017;7(21):e2592. Available from: <https://en.bio-protocol.org/en/bpdetail?id=2592&type=0>
3. Binder MJ, McCoombe S, Williams ED, McCulloch DR, Ward AC. The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyalectan proteoglycans and ADAMTS enzymes. *Cancer Letters*. 2017;385:55-64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383516306796?via%3Dihub>
4. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014; 15(12):786-801. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4316204/>
5. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2016;8:93-107. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881925/>
6. Chen D, et al. Distinct effects of different matrix proteoglycans on collagen fibrillogenesis and cell-mediated collagen reorganization. *Scientific Reports*. 2020;10(19065):[13 p.]. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-76107-0#Sec2>
7. Crespo JJA, Arminan A, Charbonnier D, et al. Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *International Journal of Cancer*. 2019;145(8):2267-2281. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6767480/>

8. De Campos EP, Brandi AJ, Massignani AM, Baptista N, Arminante JC. Modificação do método tricrômico de masson para coloração de tecidos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 1975;35/36:77-80. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/37079>
9. De Souza MCS. Potencial biomarcador da proteólise de versican no câncer de mama: um estudo em modelo canino. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/51233/Disserta%E7%E3o%20-%20Maria%20Carolina.pdf?sequence=2>.
10. Dos Reis DC, Damasceno KA, De Campos CB, et al. Versican and Tumor-Associated Macrophages Promotes Tumor Progression and Metastasis in Canine and Murine Models of Breast Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(577):[14 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2019.00577/full>
11. Eierman W, et al. Triple negative breast cancer: Proposals for a pragmatic definition and implications for patients management and trial design. *The Breast*. 2012;21(1):20-26. Available from: [https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(11\)00330-4/fulltext](https://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(11)00330-4/fulltext)
12. Federico L, Chong Z, Zhang D, et al. A murine preclinical syngeneic transplantation model for breast cancer precision medicine. *Science Advances*. 2017;3(4):[13 p.]. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1600957>
13. Franchi M, Mazola V, Bellin G, Onisto M, Karamanos KA, Peperigkou Z. Collagen Fiber Array of Peritumoral Stroma Influences Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasive Potential of Mammary Cancer Cells. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(2):213. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/8/2/213>

14. Holen I, Saleh L, Ottewell PD, Lawson MA. Chapter 4 - In vivo models used in studies of bone metastases. *Bone Sarcomas and Bone Metastases - From Bench to Bedside*. 2022;3:35-53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128216668000438>
15. Hope C, Emmerich PB, Papadas A, *et al.* Versican-Derived Matrikines Regulate Batf3–Dendritic Cell Differentiation and Promote T Cell Infiltration in Colorectal Cancer. *The Journal of Immunology*. 2017;199(5):1933-1941. Available from: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/199/5/1933/109811/Versican-Derived-Matrikines-Regulate-Batf3>
16. Instituto Nacional do Câncer: Conceito e Magnitude, Definição do câncer de mama e dados de incidência e mortalidade no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>
17. Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biology*. 2015;16(113):[16 p.]. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-015-0676-3#citeas>
18. Kelwick R, Wagstaff L, Decock J, *et al.* Metalloproteinase-dependent and -independent processes contribute to inhibition of breast cancer cell migration, angiogenesis and liver metastasis by a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-15. *Cancer Cell Biology*. 2014; 136(4):14-26. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.29129>
19. Li J, Wu J, Han J. Analysis of Tumor Microenvironment Heterogeneity among Breast Cancer Subtypes to Identify Subtype-Specific Signatures. *Genes*. 2023;24(1):44. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/1/44>
20. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

- 2011;3(12):a005058. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225943/>
21. Pantaleão C, Luchs A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 2010;69(4):439-445. Disponível em:
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2010/ses-19241/ses-19241-2271.pdf>
22. Papadas A, Arauz G, Cicala A, Wiesner J, Asimakopoulos F. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2020;68(12):871-885. Available from:
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1369/0022155420937098>
23. Papanicolaou M, Parker AL, Yam M, et al. Temporal profiling of the breast tumour microenvironment reveals collagen XII as a driver of metastasis. *Nature Communications*. 2022;13(4587):[21 p.]. Available from:
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32255-7>
24. Place AE, Huh SJ, Poliak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Research*. 2011;13(6):[11 p.]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3326543/>
25. Ricciardelli C, Sakko AJ, Ween MP, Russel DL, Horsfall DJ. The biological role and regulation of versican levels in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009;28:233-245. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-009-9182-y>
26. Schrors B, Boegel S, Albrecht C, et al. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:[14 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01195/full>
27. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-249. Available from:
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21660>

28. Timms KP, Maurice SB. Context-dependent bioactivity of versican fragments. *Glycobiology*. 2020;30(6):365-373. Available from: <https://academic.oup.com/glycob/article/30/6/365/5606652?login=false>
29. Yang S, Zhang JJ, Huang X. Mouse models for tumor metastasis. *Methods in Molecular Biology*. 2012;928:221-228. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-008-3_17
30. Yu T, Di G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2017;29(3):237-252. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5497211/>

TABELAS

Tabela 1. Respectivas recuperações antigênicas e diluições dos anticorpos e do DAB que foram utilizadas no experimento 4T1 para a técnica de imuno-histoquímica.

<i>MARCADORES</i>	<i>RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA</i>	<i>DILUIÇÃO DO ANTICORPO</i>	<i>INCUBAÇÃO DO ANTICORPO</i>	<i>DILUIÇÃO DO DAB</i>	<i>INCUBAÇÃO DO DAB</i>
<i>VCAN</i>	Tris Estufa	1:50	Overnight	1:20	3-5min
<i>VKINA</i>	Citrato EDTA Microondas	1:1000	30min	1:20	1-2min
<i>ADAMTS 15</i>	Citrato Microondas	1:400	1 hora	1:20	~ 3min

Tabela 02. Avaliação de presença de necrose, ulceração e metástase nos camundongos aos 7, 14, 21 e 28 dias de acompanhamento.

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

**n=número*

Tabela 3. Caracterização das fibras de colágeno na coloração de Tricrômico de Masson e Picrossírius.

	Tricrômico de Masson			Picrossírius – Colágeno I			Picrossirius – Colágeno III		
	<i>14 d</i>	<i>21 d</i>	<i>28 d</i>	<i>14 d</i>	<i>21 d</i>	<i>28 d</i>	<i>14 d</i>	<i>21 d</i>	<i>28 d</i>
Tumor									
Média	9.703	8.222	10.007	4.130	14.395	20.162	15.955	20.048	21.711
Desvio padrão	2.362	5.155	4.533	4.206	6.593	13.379	11.968	17.810	12.196

GRÁFICOS

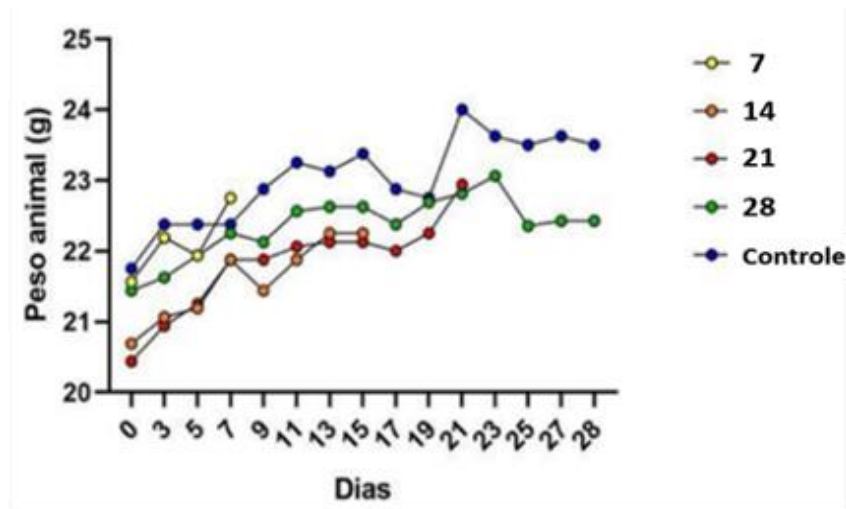


Gráfico 1. Peso dos camundongos nos grupos de 7 (Amarelo), 14 (Laranja), 21 (Vermelho) e 28 dias (Verde) de acompanhamento após inoculação de células tumorais murinas 4T1, além do grupo controle (Azul), sem inóculo de células no experimento.

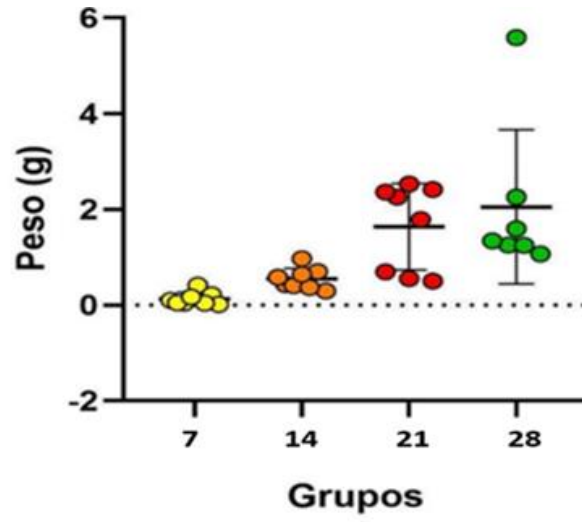


Gráfico 2. Peso dos tumores nos grupos de 7, grupo 14, grupo 21 e grupo 28 de acompanhamento após inoculação de células tumorais murinas 4T1 no experimento.

FIGURAS

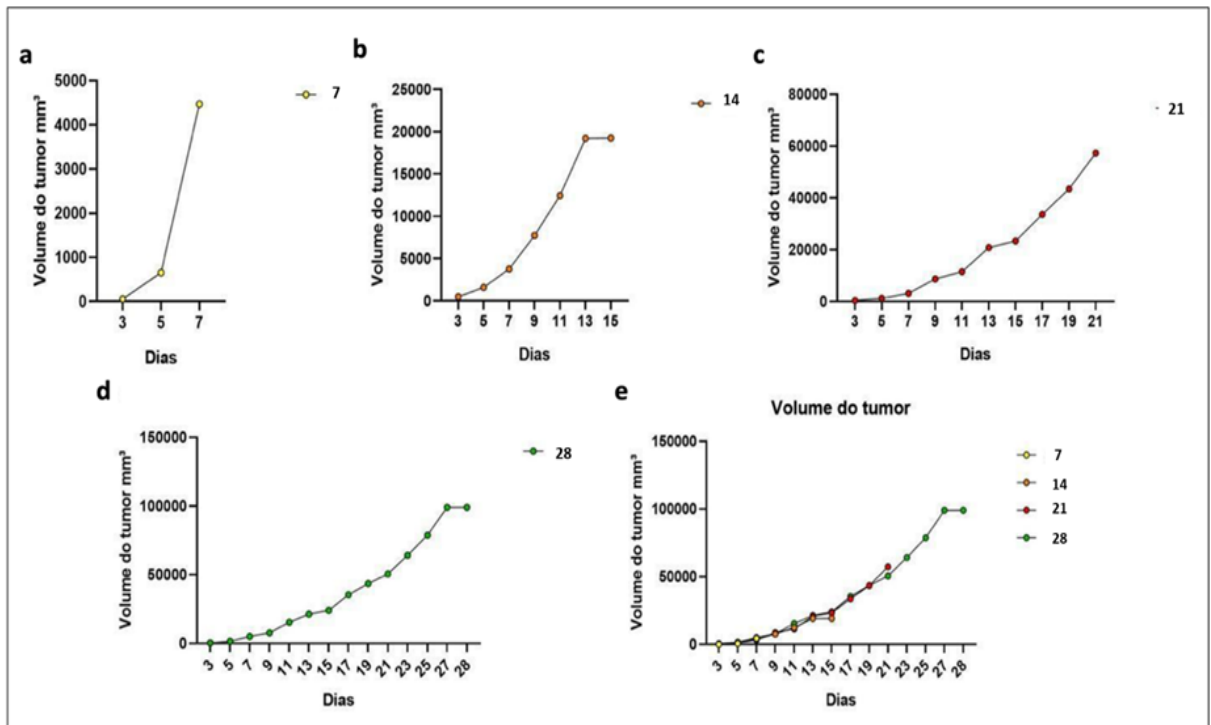


Figura 1. Volume do tumor no período de 28 dias do 1º experimento. **a.** Medição do volume do tumor no grupo de 07 dias de acompanhamento. **b.** Medição do volume do tumor no grupo de 14 dias de acompanhamento. **c.** Medição do volume do tumor no grupo de 21 dias de acompanhamento. **d.** Medição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

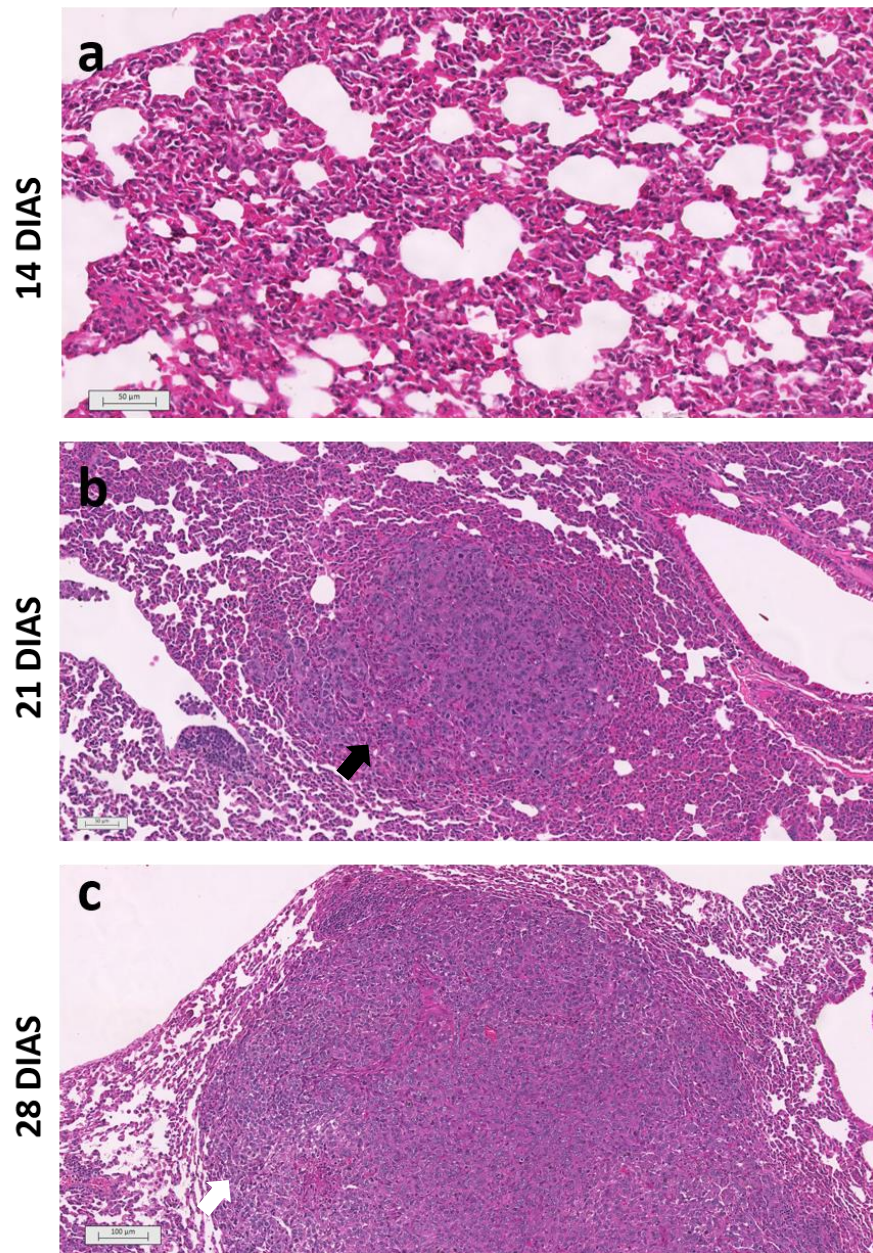


Figura 2. Parênquima pulmonar de camundongos BALB/c inoculados com tumor 4T1 e eutanasiados ao 14º, 21º e 28º dia de inoculação tumoral. **a.** Pulmão sem metástase e presença de células inflamatórias no interstício (aumento 40x). **b.** Pequena área de metástase pulmonar no grupo de 21 dias (aumento 10x), seta preta. **c.** Extensa área de metástase pulmonar no grupo de 28 dias (aumento 10x), seta branca. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

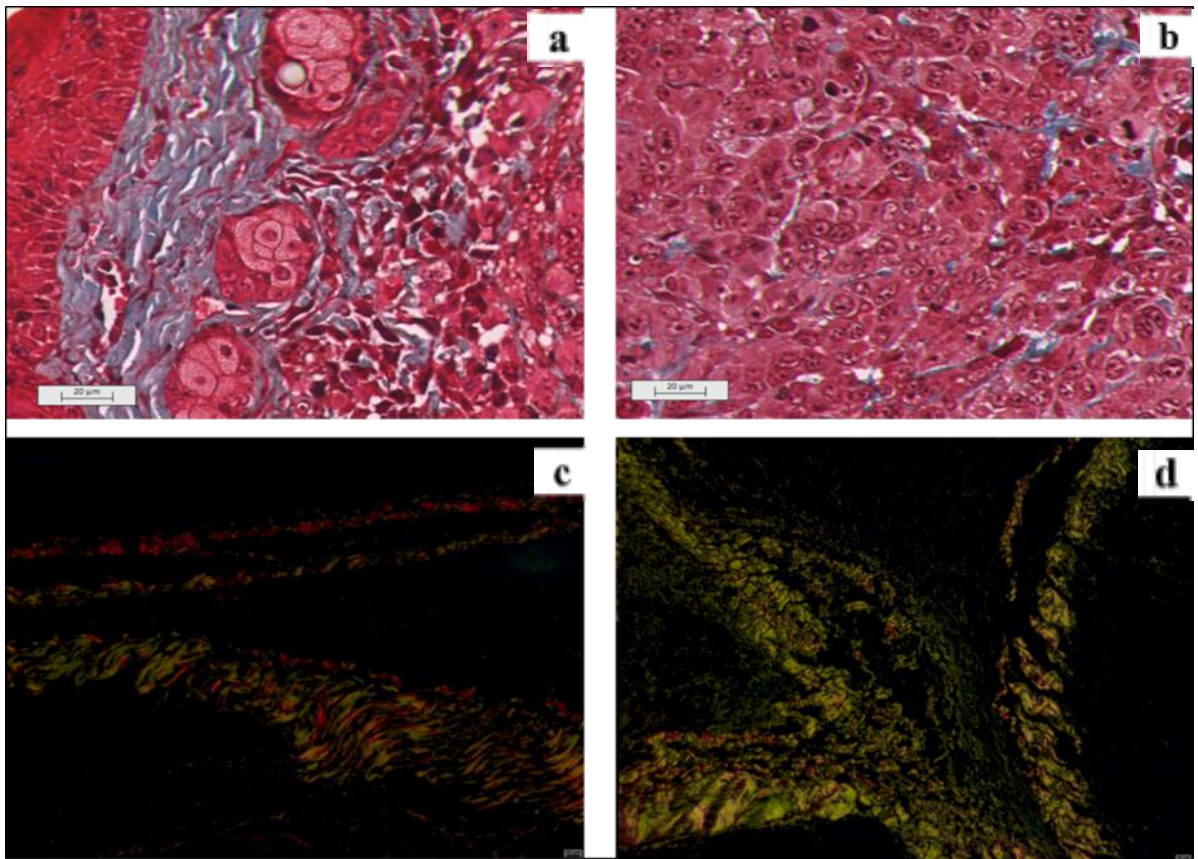


Figura 3. Coloração em Tricrômico de Masson revelando deposição de colágeno, em azul, no estroma peritumoral (a) e intratumoral (b), no aumento de 40x. Coloração em Picrosirius Red revelando deposição de colágeno tipo I (em vermelho) e tipo III (em verde) no estroma peritumoral (c e d) no aumento de 20x.

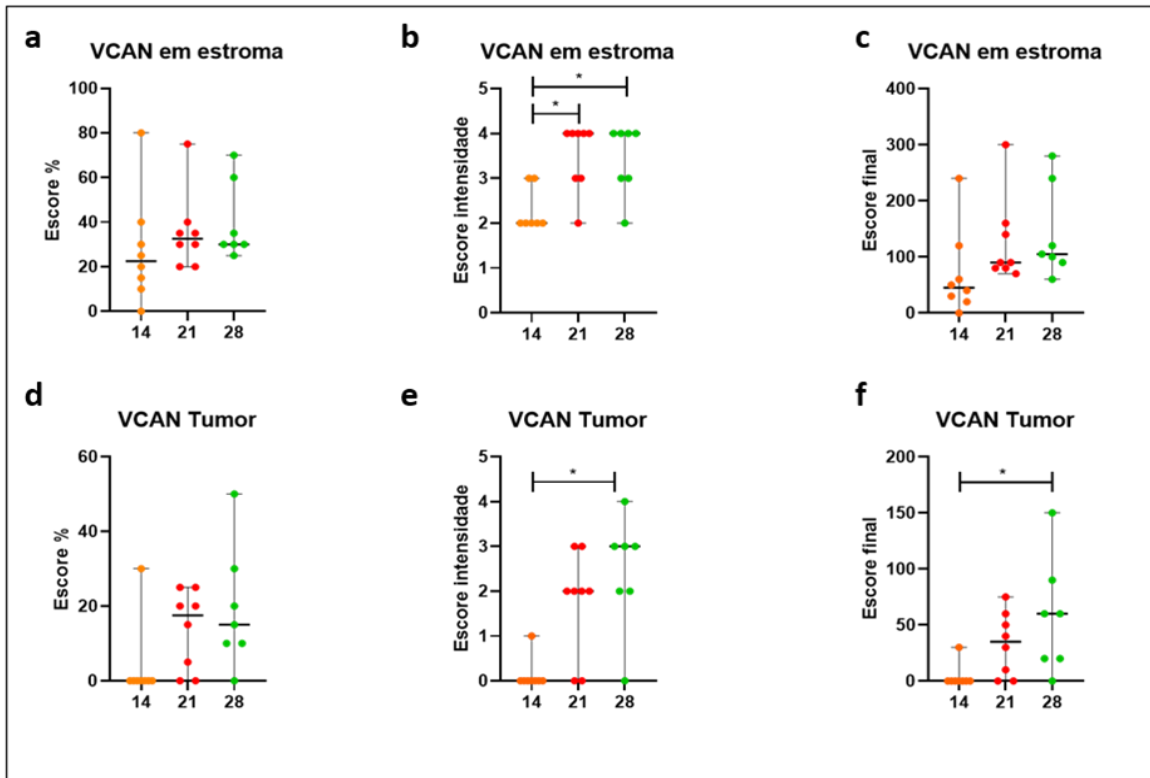


Figura 4. Expressão de VCAN no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escores de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escores de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células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

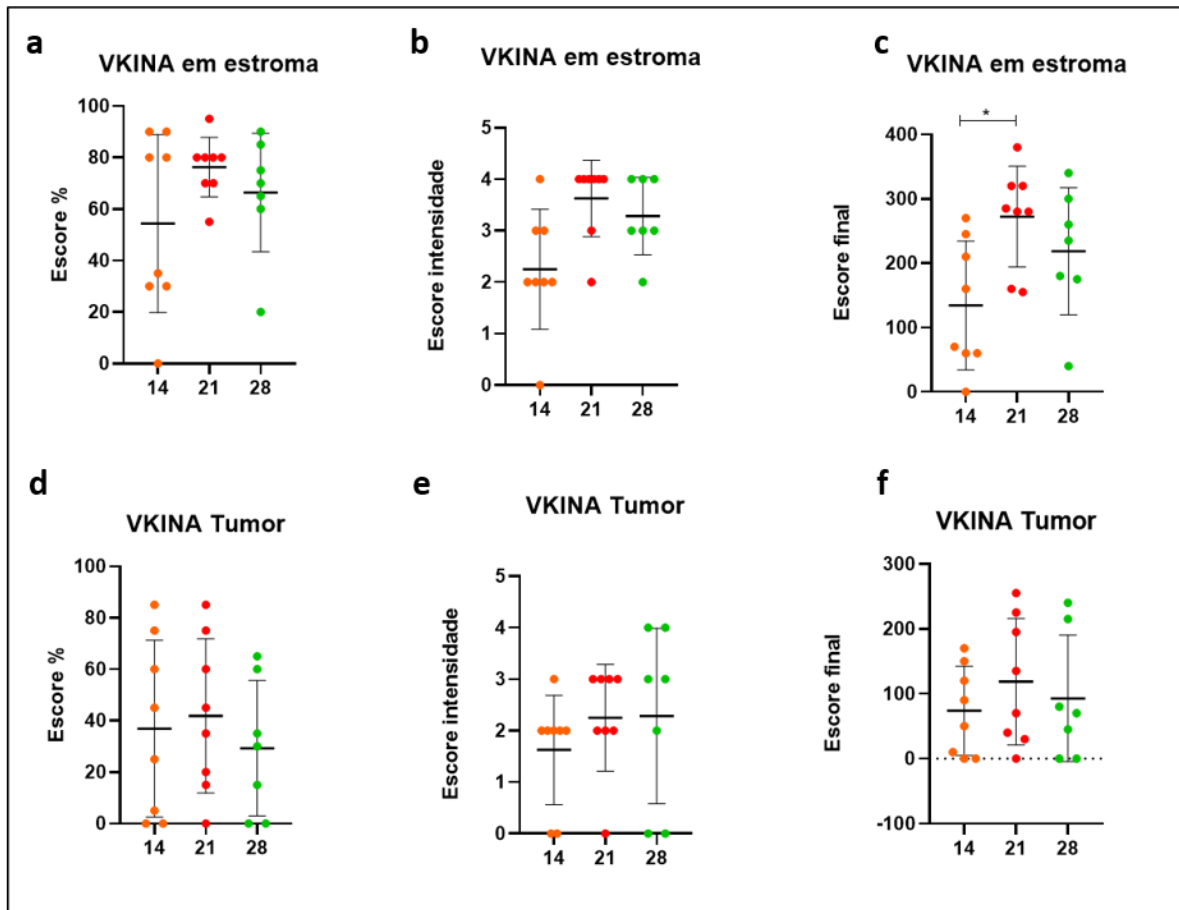


Figura 5. Expressão de Versikina no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escores de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escores de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

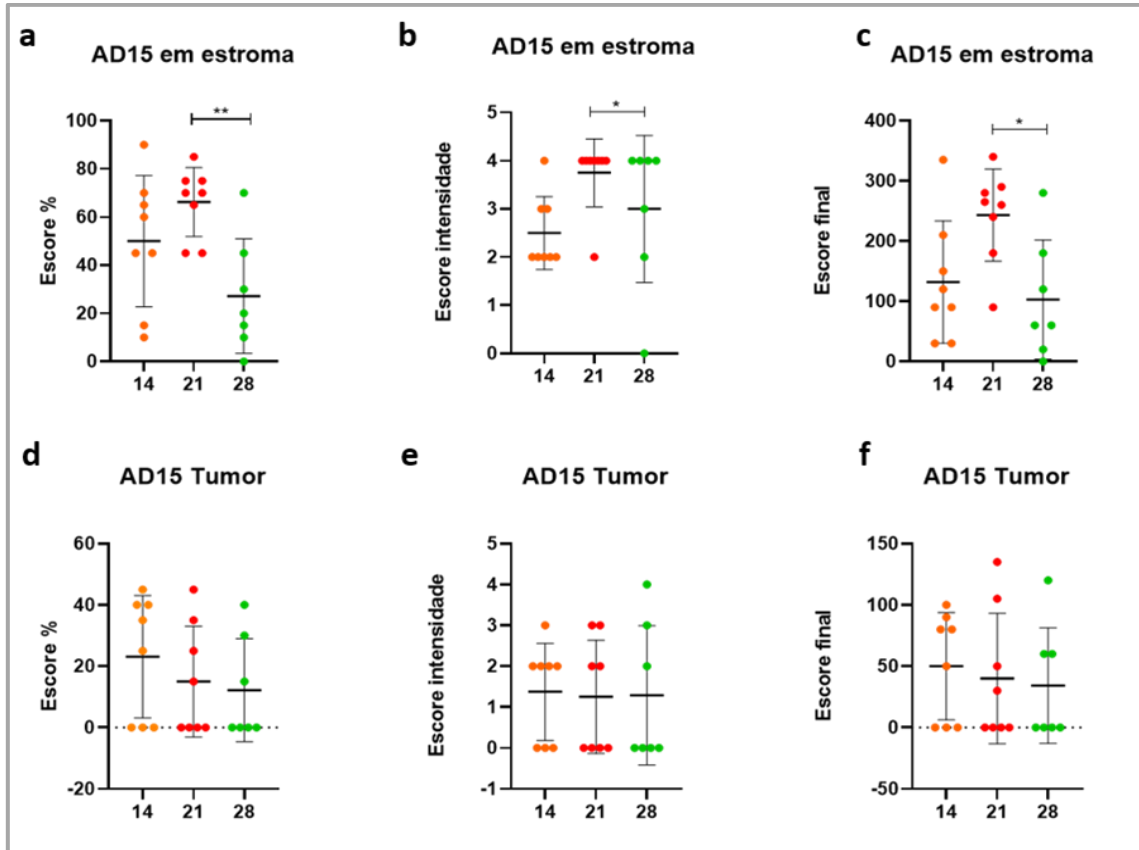


Figura 6. Expressão de ADAMTS 15 no estroma peritumoral e nas células murinas 4T1 no período de 28 dias. **a - c.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão no estroma nos grupos de 14, 21 e 28 dias. **d - f.** Escore de porcentagem, intensidade e escore final de expressão em células neoplásicas nos grupos de 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

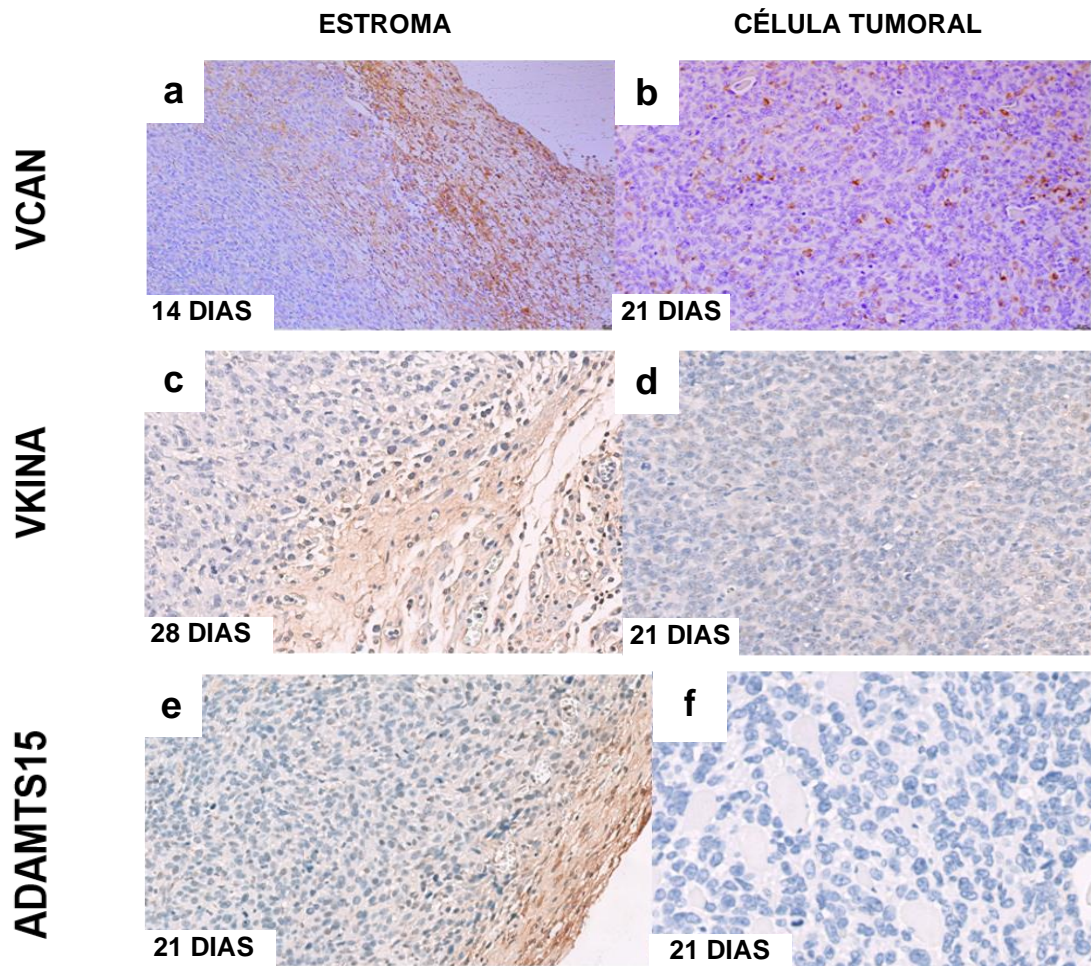


Figura 7. Expressões de VCAN, VKINA e da enzima ADAMTS 15 em tumor primário 4T1. **a.** Expressão forte de VCAN no estroma tumoral em 14 dias. **b.** Expressão forte de VCAN nas células tumorais em 21 dias. **c.** Expressão moderada de VKINA no estroma em 28 dias. **d.** Expressão fraca de VKINA nas células tumorais em 21 dias. **e.** Expressão moderada de ADAMTS15 no estroma em 21 dias. **f.** Expressão negativa de ADAMTS15 nas células tumorais em 21 dias. **a-f** Contra-coloração de hematoxilina de mayer's e marcação com DAB.

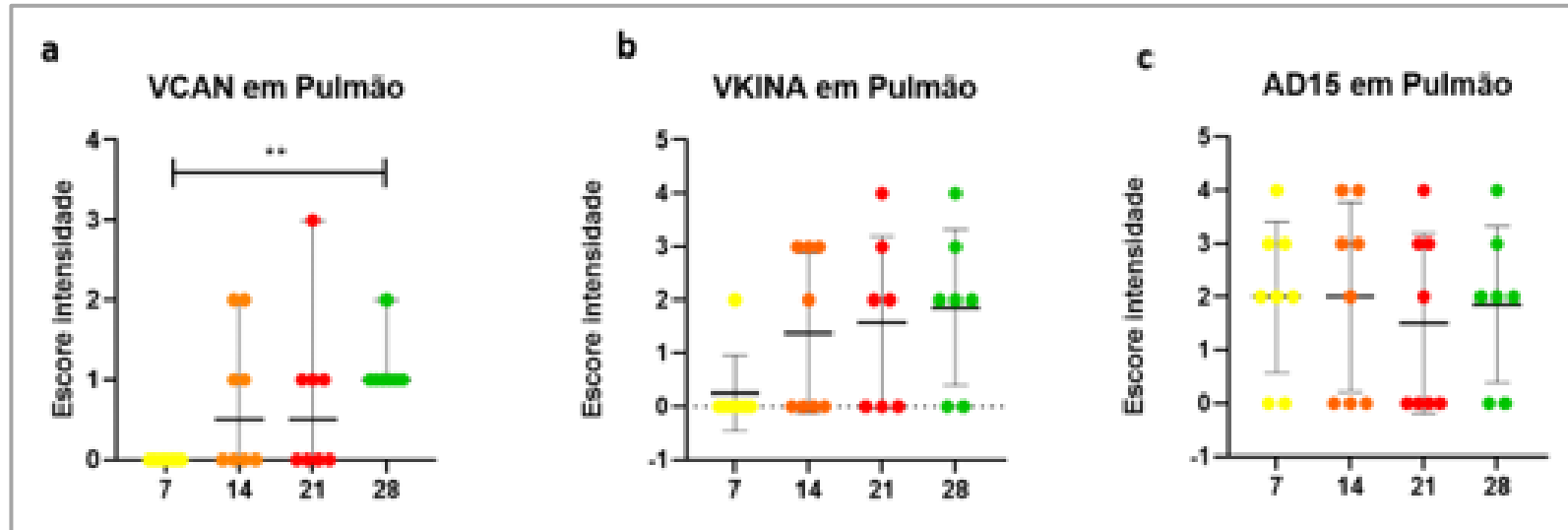


Figura 8. Expressão de (a) VCAN, (b) VKINA e (c) ADAMTS15 em parênquima pulmonar nos grupos de 7, 14, 21 e 28 dias. Teste de Kruskal Wallis. Valores de p foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

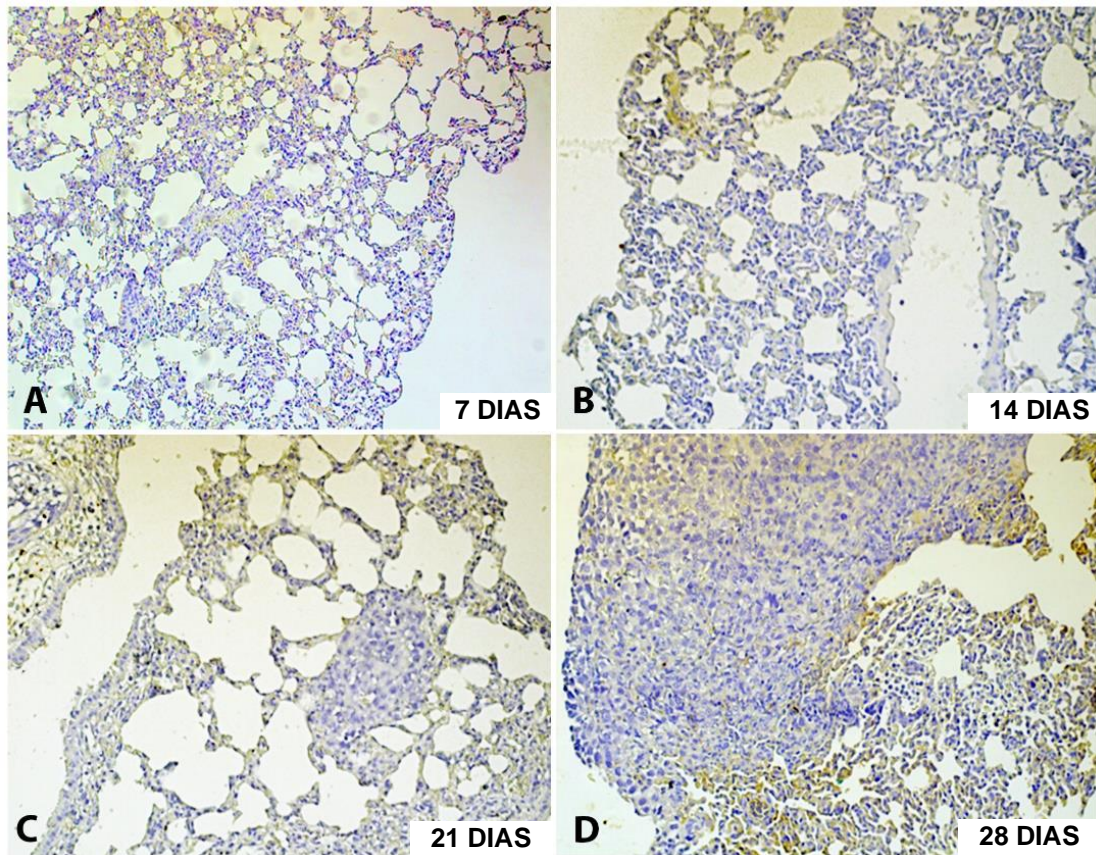


Figura 9. Expressão de VCAN em parênquima pulmonar de camundongos inoculados com células da linhagem 4T1. **a.** Expressão negativa em parênquima pulmonar aos 07 dias. **b.** Expressão fraca em parênquima pulmonar aos 14 dias. **c.** Expressão fraca em parênquima pulmonar aos 21 dias, apresentando pequeno foco de metástase. **d.** Expressão moderada em parênquima pulmonar aos 28 dias, apresentando metástase.

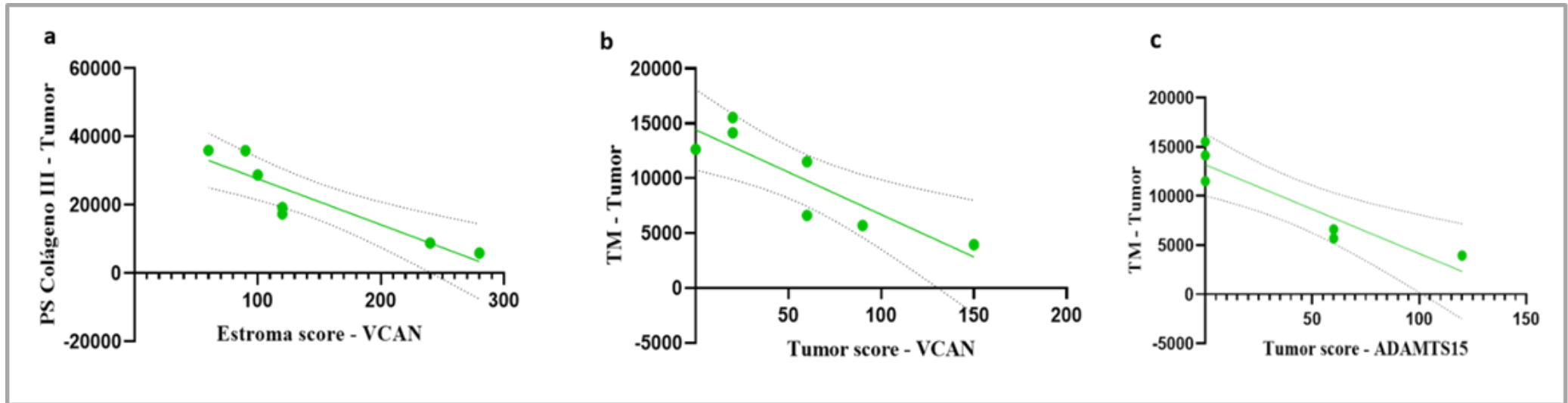


Figura 10. Correlação de deposição de colágeno na matriz extracelular, corado em Picrosirius (PS) e Tricrômico de Masson (TM), e expressão de VCAN no grupo de 28 dias em estroma (a) ($p = 0,0008$ e $r = -0,99$) e em células tumorais (b) ($p = 0,0246$ e $r = -0,85$), e de ADAMTS15 no grupo de 28 dias avaliados em células tumorais (c) ($p = 0,0333$ e $r = -0,92$). Curva de regressão linear simples.

2. PROPOSTA DE SUBMISSÃO

2.1 REVISTA: Clinical Oncology Letters

2.2 REGRAS PARA SUBMISSÃO:

- **Artigo Original:** Devem ser compostos de: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto (dividido nas seções Introdução, Métodos, Resultados, Discussão ou equivalentes, Conclusões), agradecimentos (se aplicável), lista de referências bibliográficas (máximo de 40), tabelas (se houver), legendas de figuras (se houver) e figuras (se houver).
- **Preparação:** Utilize preferencialmente o processador de texto Microsoft Word®. Os trabalhos devem ser digitados em fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo no texto e simples nas tabelas, justificados (alinhados dos dois lados), iniciando cada seção em página nova, na seguinte ordem: página de rosto, resumo e palavras-chave, abstract e keywords, texto, agradecimentos, lista de referências bibliográficas, tabelas, legendas de figuras e figuras. Todas as páginas devem ser numeradas. Siglas devem ser definidas por extenso na primeira ocorrência no texto; No resumo, o uso de siglas deve ser evitado. Substâncias devem ser apresentadas utilizando seu nome genérico. Se relevante, o nome comercial da substância e o fabricante podem ser informados entre parênteses. A apresentação de unidades de medida deve seguir o sistema internacional (SI).
- **Página de Rosto:**
 1. Título conciso e explicativo, representando o conteúdo do trabalho, em português e inglês
 2. Título resumido (máximo de 40 caracteres)
 3. Nomes dos autores
 4. Afiliação dos autores, indicando departamento/unidade, instituição e região geográfica
 5. Nome da instituição onde o trabalho foi executado

6. Informações sobre auxílios recebidos sob a forma de financiamento, equipamentos ou medicamentos
 7. Congressos onde o estudo foi apresentado
 8. Nome, endereço, telefone e e-mail do autor correspondente
- **Resumo e Abstract:** Todos os trabalhos devem apresentar um resumo em português e um abstract em inglês. O conteúdo dos textos deve ser idêntico, e não deve ultrapassar 250 palavras. Para artigos originais, o resumo deve ser estruturado como segue: Objetivo, Métodos, Resultados e Conclusões. Para relatos de caso, artigos de revisão e artigos de atualização, o resumo não deve ser estruturado.

Deve-se evitar o uso de abreviações no resumo, e não devem ser citadas referências. Logo após o resumo/abstract, deverão ser apresentadas de três a seis palavras-chave que sejam integrantes da lista de Descritores em Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br>).

- **Agradecimentos:** Esta seção é dedicada a reconhecer o trabalho de pessoas que tenham colaborado intelectualmente, mas cuja contribuição não justifica coautoria, ou de pessoas ou instituições que tenham dado apoio material.
- **Referências:** As citações serão numeradas consecutivamente, por ordem em que são mencionadas no texto. Devem ser identificadas por numerais Arábicos, em sobrescrito, tanto ao longo do texto como nas Tabelas. Exemplo: “...although the studies were not powered to detect small differences in survival^{4,5}”

A lista de referências deve ser apresentada numerada, em ordem crescente. A apresentação das referências seguirá os modelos propostos nos Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Todas as referências citadas na lista devem ser mencionadas no texto e vice-versa.

O nome dos 6 primeiros autores deve constar nas referências bibliográficas. Caso o número de autores exceda seis (6), os três primeiros deverão ser listados, seguidos da terminologia “et al. Seguem alguns exemplos:

1. Artigo de Periódico

Cubero DI, Cruz FM, Santi P, Silva ID, Del Giglio A. Tegafur-uracil is a safe alternative for the treatment of colorectal cancer in patients with partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a proof of principle. *Ther Adv Med Oncol.* 2012; 4 (4):167-72.

Cubero DI, Fumis RR, de Sá TH, et al. Burnout in Medical Oncology Fellows: a Prospective Multicenter Cohort Study in Brazilian Institutions. *J Cancer Educ.* 2015 May 9. [Epub ahead of print]

2. Artigo de Revista Eletrônica

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [revista eletrônica].* 2002 Jun [citado 2002 ago 12];102(6):[aproximadamente 3 p.]. Disponível em: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>.

3. Artigo Publicado na Internet

Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. The effectiveness of web-based vs. non-web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes. *J Med Internet Res.* 2004;6(4):e40. Disponível em: <http://www.jmir.org/2004/4/e40/>. Acessado: 29/11/2004.

4. Site

OncoLink [site na Internet]. Philadelphia: University of Pennsylvania; c1994-2006. [atualizado 2004 set 24; citado 2006 mar 14]. Disponível em: <http://cancer.med.upenn.edu/>.

- **Tabelas e Figuras:** Tabelas e figuras (gráficos, fotografias, etc.) devem ser numeradas em algarismos arábicos conforme a ordem de aparecimento no texto e devem ter legendas individuais, apresentadas ao final do trabalho. Cada tabela e figura deve ser submetida em folha separada. A *Clinical Oncology Letters* utiliza a publicação em preto e branco, portanto todas as imagens devem ser enviadas em tons de cinza ou preto e branco. Nas tabelas, deverão ser utilizadas apenas linhas horizontais, e cada dado deverá

constar em uma célula independente. Explicações sobre itens das tabelas devem ser apresentadas em notas de rodapé identificadas pelos seguintes símbolos, nesta sequência: *,†, ‡, §, ||,¶,**,††,‡‡. Figuras em geral (gráficos, fotografias, etc.) serão publicadas em preto e branco. Despesas com a eventual reprodução de fotografias em cores poderão ser de responsabilidade do autor. Figuras podem ser submetidas eletronicamente, nas extensões .jpg, .gif ou .tif, com resolução mínima de 300 dpi (para possibilitar uma impressão nítida). Fotografias de pacientes não devem permitir sua identificação. Gráficos devem ser apresentados somente em duas dimensões. Figuras já publicadas e incluídas em artigos submetidos devem indicar a fonte original na legenda e devem ser acompanhadas por uma carta de permissão do detentor dos direitos (editora ou revista).