

KARINE ARAÚJO DAMASCENO

**EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA ASSOCIAÇÃO COM OS
RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR CD44, EGFR, HER-2 e
HER-3 NOS TUMORES PRODUTORES DE MATRIZ DA
GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA**

**Belo Horizonte
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG
FACULDADE DE MEDICINA**

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA ASSOCIAÇÃO COM
RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR CD44, EGFR, HER-2 e
HER-3 NOS TUMORES PRODUTORES DE MATRIZ DA
GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA**

**Belo Horizonte
2016**

KARINE ARAÚJO DAMASCENO

**EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA ASSOCIAÇÃO COM
RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR CD44, EGFR, HER-2 e
HER-3 NOS TUMORES PRODUTORES DE MATRIZ DA
GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

Co-Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA KARINE ARAUJO DAMASCENO

Realizou-se, no dia 29 de fevereiro de 2016, às 14:00 horas, Nello de Moura Rangel Bloco K3/163 - ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA ASSOCIAÇÃO COM RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR CD44, EGFR, HER-2 e HER-3 NOS TUMORES PRODUTORES DE MATRIZ DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA*, apresentada por KARINE ARAUJO DAMASCENO, número de registro 2012667192, graduada no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Geovanni Dantas Cassali - Orientador (UFMG), Prof(a). Enio Ferreira (UFMG), Profa. Alessandra Estrela-Lima (UFBA), Prof. Rafael Malagoli Rocha (FM-UNIFESP), Profa. Marina De Brot Andrade (UFMG) e Prof. Dawidson Assis Gomes (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2016.

Prof. Geovanni Dantas Cassali (Doutor)

Prof. Enio Ferreira (Doutor)

Profa. Alessandra Estrela-Lima (Doutora)

Prof. Rafael Malagoli Rocha (Doutor)

Profa. Marina De Brot Andrade (Doutora)

Prof. Dawidson Assis Gomes (Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

EXPRESSÃO DE VERSICAN E SUA ASSOCIAÇÃO COM RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR CD44, EGFR, HER-2 e HER-3 NOS TUMORES PRODUTORES DE MATRIZ DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA

KARINE ARAUJO DAMASCENO

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Giovanni Dantas Cassali - Orientador
UFMG

Prof. Erió Ferreira
UFMG

Profa. Messandra Estrela-Lima
UFBA

Prof. Rafael Malgoli Rocha
FM UNIFESP

Profa. Marina De Brot Andrade
UFMG

Prof. Dawidson Assis Gomes
UFMG

Belo Horizonte, 29 de fevereiro de 2016.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Filipenses 4

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã
e às minhas tias Edinha “in memoriam” e Zibinha*

AGRADECIMENTOS

Neste singelo trecho, deixo aqui registrado meus mais sinceros agradecimentos aos que contribuíram não só durante o doutoramento, mas também ao longo da minha breve caminhada acadêmica.

À Deus, que sustenta a minha fé, me inspira, ampara e ilumina os meus caminhos.

Aos meus queridos pais, por me amarem incondicionalmente e por me ensinarem que o que há de mais precioso no ser humano é o conhecimento, algo que jamais poderá ser arrancado de nós.

À minha amada irmã, companheira e amiga, pelo sentimento que nos une, pelo incentivo e por me tornar o seu exemplo. Espero ser merecedora disso...

Ao meu orientador Geovanni, por todas as lições dadas ao longo desse período. Sua paixão e dedicação a profissão me inspiram! Obrigada pelo incentivo, pela confiança, pelos conselhos e pela amizade!

Ao meu coorientador Enio, por sempre se fazer solícito e me ajudar a encontrar soluções nos momentos mais desafiadores, além de me instigar com suas discussões! Sou muito grata pela sua amizade, apoio, incentivo e aconselhamentos!

À Alessandra, por ter me ensinado que podemos ser melhores quando amamos aquilo que fazemos! Serei sempre grata por ter me apresentado e incentivado a seguir o caminho da ciência. Ao final desta etapa sinto-me privilegiada por você ter sido minha primeira orientadora, minha mãe patológica! Sua paixão, determinação e coragem me inspiram! Espero fazer jus aos seus grandes ensinamentos!

À Angélica, por ser um exemplo de dedicação e determinação! Obrigada pelo seu incentivo, carinho e amizade!

Aos amigos do LPC, Cecília, Lilian, Marina, Diego, Fernanda Camargo, Lidiane, Tatiany, Istéfani, Stefane, Mirian, Fernanda Freitas, Isabel, Emerson, Carol, Maria, Bruna de Cássia, Ana Maciel, Bruna, Gabriel e Paula pelas amizades construídas ao longo do mestrado e doutorado, além de tornarem meus dias de trabalhos mais alegres!

Ao meu amigo Conrado, pela parceria e amizade construída durante esse tempo! Obrigada pela cumplicidade, incentivo e aprendizado!

Ao meu querido amigo Diego, pela paciência, pelas conversas intermináveis e amáveis conselhos nos momentos de estresse. Sou imensamente grata pela bela amizade que temos!

Às minhas ICs, Bruna, Yasmin, Luisa e Fê, por terem me auxiliado de forma imprescindível na execução dos trabalhos!

À querida Gi, por tanto ter me auxiliado nas atividades do laboratório, além de todo o carinho dedicado!

À Lore, minha irmã patológica. Com certeza, nossa caminhada ao longo do doutorado foi amenizada pela nossa cumplicidade! Obrigada pelos conselhos ou por simplesmente se fazer ouvidos!

Às queridas amigas, Naty e Kekely, que com tanta simplicidade e doçura tornaram minha estadia em BH mais leve e acolhedora!

Às amizades enlaçadas em BH, Paty, Gustavo, Michele, Karen, Ermilton, Cairo, João e Saira.

Ao meu namorado Adriano, pelo seu carinho, companheirismo e grande apoio nesta etapa final!

Ao professor André da Escola de Farmácia/UFMG, pelo auxílio na preparação das reações enzimáticas.

Ao Professor Dawidson e Michele, pela gentileza e por se fazerem sempre tão solícitos! Obrigada pela colaboração na execução das reações de imuno-fluorescência e captura das imagens.

Ao Dr. Rafael Malagoli e Mariana Rezende, por viabilizarem a ida ao Hospital AC Camargo para execução das reações de Hibridização *In Situ*.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV/UFBA, ao Laboratório de Patologia e Hospital Veterinário/UFMG por cederem amostras e disponibilizarem o acervo de dados clínicos e patológicos.

À Lais e Fernadas, Freitas e Camargo, por me ajudarem na coleta de dados.

Aos professores e técnicos do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFMG, por ter permitido todo o trabalho possível.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho...

Muito obrigada!



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral-ICB/UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Matrix-extracelular e câncer	23
2.1.1 Composição e função da matriz extracelular.....	23
2.1.2 Proteoglicanos	24
2.1.3 Versican.....	25
2.1.3.1 Estrutura e função do versican	25
2.1.3.2 Regulação da expressão de versican.....	27
2.1.3.3 Versican e câncer.....	28
2.1.3.4 Interação de versican com CD44.....	32
2.1.3.5 Interação de versican com receptores de fator de crescimento epidérmico.....	33
2.2 Tumores mamários caninos: modelo para estudo do câncer	35
2.2.1 Tumores mistos da glândula mamária canina.....	36
2.2.1.1 Tumor misto benigno.....	36
2.2.1.2 Carcinoma em tumor misto.....	37
2.2.1.3 Carcinossarcoma.....	39
2.2.2 Carcinoma metaplásico da mama humana.....	39
3. HIPÓTESES	41
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo geral.....	41
4.2 Objetivos específicos.....	41
5. MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 Espécimes mamários.....	42
5.2 Estadiamento (TNM).....	42
5.3 Histopatologia.....	42
5.4 Graduação histopatológica.....	43
5.5 Imuno-histoquímica.....	44
5.5.1 Avaliação imuno-histoquímica.....	45
5.6 Microscopia confocal de fluorescência.....	46
5.7 Hibridização <i>in situ</i> de RNAm.....	46
5.8 Análise estatística.....	47
5.10 Aspectos Éticos.....	48
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
ARTIGO 1	49
ARTIGO 2	64
7. CONCLUSÕES GERAIS	79
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
10. ANEXOS	95

Anexo 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela.....	95
Anexo 2 - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.....	96
Anexo 3 - Certificado CEUA.....	97
APÊNDICES	98
APÊNDICE A - Resultados parciais.....	98
APÊNDICE B - Atividades desenvolvidas no período do doutorado.....	102

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Isoformas de versican	27
Figura 2	Interação de versican e outras moléculas. A localização dos sítios de ligação do versican com outras moléculas	31
Artigo 1 - Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland		
Figura 1	Benign mixed tumours in canine mammary gland. (a) Benign epithelial and myoepithelial cells proliferation with mixoid matrix areas. HE, 40x. (b) Low stromal versican expression adjacent to benign epithelial cells proliferation. 60x. (c) Incomplete membrane EGFR staining in benign epithelial cells. 60x. (d) Incomplete membrane HER-2 staining in benign epithelial cells. 60x. (e) Weak cytoplasmic HER-3 expression in benign epithelial cells in benign mixed tumour. 60x. (f) Moderate CD44 expression in benign epithelial cells. 20x. (b-f) Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain.	55
Figura 2	(a) Versican, (b) EGFR, (c) HER-2 and (d) CD44 expression in benign mixed tumours (BMT), carcinomas in mixed tumours (CMT) and carcinosarcomas (CS). Difference between normal (N) and benign (B) epithelial cells in BMT and between <i>in situ</i> (IS) and invasive (IN) areas in CMT and CS. Wilcoxon test. *p<0.05 **p<0.001	57
Figura 3	Carcinoma in mixed tumor in canine mammary gland. (a) Malignant epithelial cells proliferation adjacent to osteoid matrix in carcinoma in mixed tumor of canine mammary gland. HE, 20x. (b) Moderate stromal versican expression adjacent to <i>in situ</i> carcinomatous areas. 40x. (c) Strong stromal versican expression adjacent to invasive carcinomatous areas. 40x. (d) Complete membrane EGFR staining in <i>in situ</i> carcinomatous areas. 40x. (e) Incomplete membrane EGFR staining in invasive carcinomatous areas. 60x. (f) Incomplete membrane HER-2 staining in invasive carcinomatous areas in carcinoma in mixed tumour. 60x. (g) Weak cytoplasmic HER-3 expression in <i>in situ</i> and invasion. 40x. (h) Strong CD44 expression in <i>in situ</i> carcinomatous areas. 60x. (i) Moderate to strong CD44 expression in invasive carcinomatous areas. 40x. (b-i) Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain.	58
Figura 4	Cytoplasmic (C), nuclear (N) and membrane (M) HER-3 expression in BMT, CMT and CS. Difference between normal and benign epithelial cells in (a) BMT and between <i>in situ</i> and invasive areas in (b) CMT and (c) CS. Different	59

letters demonstrate where statistical differences were present ($P < 0.05$). Wilcoxon test.

Figura 5 Carcinosarcoma in canine mammary gland. (a) Malignant spindle epithelial cells proliferation in carcinosarcoma of canine mammary gland. HE, 10x. (b) Moderate stromal versican expression adjacent to in situ carcinomatous areas. 40x. (c) Strong stromal versican expression adjacent to invasive areas. 40x. (d) Incomplete membrane EGFR staining in invasive carcinomatous areas. 60x. (e) Incomplete membrane HER-2 staining in in situ carcinomatous area. 40x. (f) Increased membrane HER-2 expression in invasive area. 60x. (g) Cytoplasmic HER-3 expression in invasive carcinomatous areas in carcinosarcoma. 60x. (h) Strong CD44 expression in in situ carcinomatous areas. 40x. (i) Strong CD44 expression in invasive carcinomatous areas. 40x. (b-i) Immunohistochemical stain with Mayer's haematoxylin counterstain. 60

Artigo 2 - HER-2 and EGFR mRNA expression and its relationship with versican in malignant matrix-producing tumours of the canine mammary gland

Figura 1 Differences versican expression in *in situ* (IS) and invasive (IN) carcinomatous areas in versican low (G1) and high (G2) expression groups in canine mammary tumours. Wilcoxon test. 71

Figura 2 (A)(B) EGFR and (C)(D) HER-2 mRNA expression in canine mammary tumours. Difference between *in situ* (IS) and invasive (IN) areas in versican low (G1) and high (G2) expression groups. Wilcoxon test. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$. 73

Figura 3 RNA-ISH analysis of EGFR gene expression in canine mammary tumours showing cytoplasmic dots. (A) *In situ* carcinomatous areas showing RNA ISH score 3: in carcinomas in mixed tumours. (B) Invasive carcinomatous areas showing RNA ISH score 0 in carcinomas in mixed tumours (dots indicated by red arrow). (C) *In situ* carcinomatous áreas showing RNA ISH score 2 in carcinosarcoma. (D) Invasive carcinomatous áreas showing RNA ISH score 1 in carcinosarcoma (magnification x60). 74

Figura 4 RNA-ISH analysis of HER-2 gene expression in canine mammary tumours showing cytoplasmic dots. (A) *In situ* carcinomatous areas showing RNA ISH score 4 in carcinomas in mixed tumours (magnification x40). (B) Invasive carcinomatous areas showing RNA ISH score 1 in carcinomas in mixed (magnification x60). (C) *In situ* carcinomatous areas showing RNA ISH score 3 in carcinosarcoma (magnification x60). (D) Invasive carcinomatous areas showing RNA ISH score 0 in carcinosarcoma (magnification x60). 75

Figura 5 Fig 5. (A)(B) EGFR and (C)(D) HER-2 expression in canine 76
mammary tumours. Difference between *in situ* (IS) and
invasive (IN) areas in versican low (G1) and high (G2)
expression groups. Wilcoxon test. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 - Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland

Tabela 1	Clinicopathological characteristics of canine mammary benign mixed tumours (BMTs), carcinomas in mixed tumours (CMTs) and carcinosarcomas (CSs).....	54
Tabela 2	Immunoreactivity for versican, EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in canine mammary benign mixed tumours (BMTs), carcinomas in mixed tumours (CMTs) and carcinosarcomas (CSs).....	56
Tabela 3	Clinicopathological characteristics of low (Group 1) and high (Group 2) versican expression of canine mammary carcinomas in mixed tumours (CMTs) and carcinosarcomas (CSs).....	59
Tabela 4	Differences EGFR, HER-2, cytoplasmic HER-3 and CD44 expressions in <i>in situ</i> and invasive carcinomatous areas between versican low and high expression groups in CMTs and CSs.	61

Artigo 2 - HER-2 and EGFR mRNA expression and its relationship with versican in malignant matrix-producing tumours of the canine mammary gland survival

Tabela 1	Clinicopathological characteristics of canine mammary carcinomas in mixed tumours (CMTs) and carcinosarcomas (CSs).....	70
Tabela 2	EGFR and HER-2 expression by immunohistochemistry (IHC) and their mRNA by <i>in situ</i> hybridization (ISH) in canine mammary carcinomas in mixed tumours and carcinosarcomas.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- Δ Np63: Isoforma (sem a porção amino-terminal) da proteína p63
- AH: Ácido hialirônico
- AP: Adenoma pleomórfico
- ASCO/CAP: Sociedade Americana de Oncologia Clínica/Colégio Americano de Patologistas
- CD44: Cluster of differentiation
- CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CGA: Campos de grande aumento
- CMT: carcinoma in mixed tumours
- CS: carcinossarcoma
- CSPG2: Proteoglicano de sulfato de condroitina 2
- CTM: carcinoma em tumor misto
- CXPA: carcinoma e-adenoma pleomórfico
- DAB: Diaminobenzidina
- EGF: Fator de crescimento epidérmico
- EGFR (ErbB1, HER1): Receptor para fator de crescimento epidérmico
- ErbB: Receptor de fator de crescimento epidérmico
- ErbB2 (HER2): Receptor para fator de crescimento epidérmico 2
- ErbB3 (HER3): Receptor para fator de crescimento epidérmico 3
- ErbB4 (HER4): Receptor para fator de crescimento epidérmico 4
- ERK: *Extracellular-signal-regulated kinases* ou quinase regulada por sinal extracelular
- FFPE: Formalin-fixed, paraffin-embedded
- GAG: Glicosaminoglicano
- H&E: Hematoxilina e Eosina
- HER-1: Receptor para fator de crescimento epidérmico 1
- HER-2: Receptor para fator de crescimento epidérmico 2
- HER-3: Receptor para fator de crescimento epidérmico 3
- ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- IHQ: Imuno-histoquímica
- IL-1 β : Interleucina 1 β
- IL-1 α : Interleucina 1 α

kb: pares de bases

kDA: kilo daltons

p38 MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases* - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MEC: Matriz extracelular

MicroRNA (miR ou miRNA): pequenos RNAs não codificantes

NF-Kb: Factor nuclear kappa B

OMS: Organização Mundial de Saúde

p53: gene supressor tumoral

p63: gene da família p53

PBS: Tampão fosfato-salino ou *phosphate buffered saline*

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PG: Proteoglicano

PI3K : fosfatidilinositol 3-quinase

PKB: proteína quinase B

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

RTK: receptor tirosina quinase

TGF-β: Fator de crescimento tumoral

TLR; Tool-like receptor

UFBA: Universidade Federal da Bahia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UTR: untranslated region

v0: isoforma 0 de versican

v1: isoforma 1 de versican

v2: isoforma 2 de versican

v3: isoforma 3 de versican

VCAN: versican

WHO: World Health Organization

RESUMO

Versican é um proteoglicano de matriz extracelular que tem sido relacionado com a motilidade celular, perda de adesão e progressão tumoral. Esta motilidade é proveniente da interação do versican com receptores de superfície celular. Estudos em tumores mamários caninos também denotam a superexpressão desta molécula em matriz extracelular adjacente às áreas invasoras. Diante das evidências da participação deste proteoglicano na progressão tumoral, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de versican e sua relação com a expressão protéica dos receptores de superfície celular EGFR, HER-2, HER-3 e CD44 e expressão gênica de EGFR e HER-2 em tumores mistos benignos (TMB), carcinomas em tumores mistos (CTMs) e carcinossarcomas (CSs) da mama de cadelas. Os tumores malignos foram divididos em grupos de baixa e alta expressão de versican em estroma. Os resultados mostraram que tumores mistos benignos apresentaram fraca expressão de versican e uma correlação positiva entre versican e EGFR em áreas benignas. Nos CTMs e CSs, foi observada uma maior expressão de versican em estroma adjacente às áreas epiteliais invasoras comparada às áreas *in situ* denotando uma direta relação entre a expressão de versican e invasividade. Além disso, CSs que superexpressavam versican em áreas invasoras também apresentaram maior expressão de HER-2, HER-3 citoplasmático e CD44. A avaliação da expressão gênica de EGFR, assim como de HER-2, mostrou significante diferença entre áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras em ambos os grupos de baixa e alta expressão de versican. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas na expressão gênica de *EGFR* e *HER-2* entre os grupos de alta e baixa expressão de versican. Desta forma, os receptores de superfície celular (HER-2, HER-3 e CD44) são mais evidentes em tumores mais agressivos, os quais superexpressam versican em estroma adjacente às áreas invasoras. Além disso, a maior expressão de RNAm assim como de proteínas EGFR e HER-2 nas áreas carcinomatosas *in situ* sinaliza a participação dessas moléculas nos estágios iniciais de progressão tumoral. Tais achados indicam que a associação entre essas moléculas pode estar relacionada ao comportamento biológico e a agressividade destes tumores.

Palavras-chave: Versican, EGFR, HER-2, HER-3, CD44, hibridização *in situ*, tumores mamários, canino

ABSTRACT

Versican is an extracellular matrix proteoglycan that has been identified as a modulator of cell motility, adhesion loss and tumour progression. This motility results from the interaction between versican and cell surface receptors. Studies have also demonstrated the relationship between this molecule and invasion in canine mammary tumours. Given the evidence for the participation of proteoglycans in tumour progression, this study aimed to assess versican expression and its association with cell surface receptors; human epidermal growth factor receptors 1, 2, and 3 (EGFR, HER-2, and HER-3) and CD44 and gene expressions of EGFR and HER2 in benign mixed tumours (BMTs), carcinomas in mixed tumours (CMTs), and carcinosarcomas (CSs) of the canine mammary gland. Malignant tumours were divided into low and high groups with respect to versican stromal expression. The results indicated that the BMTs showed weak stromal versican expression and correlations between the expression of stromal versican and EGFR in the epithelial membrane in benign areas. A higher stromal versican expression was observed adjacent to invasive epithelial areas compared with *in situ* areas in CMTs and CSs, suggesting a direct relationship between versican expression and invasiveness. Furthermore, the CSs exhibited a higher expression of HER-2, cytoplasmic HER-3, and CD44 in epithelial invasive cells in cases of higher stromal versican expression. ISH evaluation of EGFR and HER-2 mRNA expression showed a significant difference between *in situ* and invasive carcinomatous areas in both groups (low and high versican expression), the first showing more dots than the last. No statistical difference was observed between low and high versican expression groups. Therefore, the cell surface receptors (HER-2, HER-3, and CD44) are more evident in CSs that overexpress versican in stroma adjacent to the invasive areas. Furthermore, most EGFR and HER-2 mRNAs as well as proteins expression in *in situ* carcinomatous areas indicates the involvement of these molecules in early stages of tumour progression. These findings suggest that the association between these molecules may be directly related to the biological behaviour and invasiveness of these canine mammary tumours.

Keywords: Versican, EGFR, HER-2, HER-3, CD44, In Situ hybridization, mammary gland tumours, canine.

1. INTRODUÇÃO

Os tumores mamários em cadelas estão entre as lesões proliferativas mais frequentes na rotina clínica dos animais de companhia (PELETEIRO, 1994), correspondendo a 52% de todas as neoplasias. A taxa de malignidade destes tumores pode variar entre 50 a 90% (TORÍBIO, 2008; CASSALI et al., 2009; ESTRELA-LIMA et al., 2010).

De acordo com o atual sistema de classificação veterinária, os tumores mistos benignos representam 40 a 50% dos tumores benignos diagnosticados (CASSALI et al., 2009). Estes são caracterizados pela proliferação benigna de células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais (MISDORP et al., 1999). Uma importante característica morfológica nestes tumores é a formação da matriz mixóide, a qual é constituída pela proliferação de células fusiformes, de origem mioepitelial, e por substância mixomatosa, além da matriz cartilaginosa e/ou óssea (MISDORP et al., 1999; ERDÉLYI et al., 2005).

Dentre os tumores malignos da glândula mamária canina, o mais frequente é o carcinoma em tumor misto (TORÍBIO et al., 2008; CASSALI et al., 2009; ESTRELA-LIMA et al., 2010), que tem origem a partir da transformação maligna do componente epitelial do tumor misto benigno. A proliferação carcinomatosa que surge nos tumores mistos pode apresentar crescimento *in situ* ou infiltrativo, evidenciado pela perda da continuidade das camadas mioepitelial e basal associado à invasão de células neoplásicas no estroma, ou ainda substituir completamente a lesão benigna pré-existente (CASSALI et al., 2014).

Outro tipo histológico caracterizado pela proliferação tanto do componente epitelial como do componente mesenquimal é o carcinosarcoma. Neste caso, ambos os componentes são malignos. Este tipo é menos frequente na cadela e apresenta prognóstico desfavorável (CASSALI et al., 2014). As características histológicas do carcinosarcoma são extremamente variáveis (MISDORP et al., 1999), podendo ser observado em alguns casos proliferação mioepitelial com produção de matriz mixóide, semelhante ao que ocorre nos tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos. Os fatores genéticos que resultam na transformação maligna e progressão destes tumores ainda são pouco conhecidos.

No processo de desenvolvimento tumoral, a matriz extracelular desempenha importante papel ao criar um microambiente favorável à invasão (LIOTTA; KOHN, 2001; KISCHEL

et al., 2010; CANAVESE et al., 2011). Estas modificações no estroma são reflexos das alterações sofridas pelas células neoplásicas, as quais são capazes de induzir mudanças na matriz a partir da produção e secreção de citocinas e fatores estimuladores de crescimento (LIOTTA e KOHN, 2001).

Entre os múltiplos componentes da matriz extracelular tumoral, o versican tem posição de destaque devido ao seu papel na progressão, adesão e proliferação celular (PUKKILA et al., 2004; SUWIWAT et al., 2004; RICCIARDELLI et al., 2007; YEE et al., 2007; KISCHEL et al., 2010; CANAVESE et al., 2011). Versican é um proteoglicano de sulfato de condroitina e está presente na matriz de vários tecidos maduros, incluindo músculo liso, cartilagem, pele e sistema nervoso central (BODE-LESNIEWSKA et al., 1996). Esta proteína contém vários domínios ativos, sendo constituída por um domínio N-terminal (G1), que se liga 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. O domínio central constituído por duas cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) está localizado entre os domínios G1 e G3. Mudanças na transcrição entre estes domínios dão origem a quatro isoformas, conhecidas como v0, v1, v2 e v3. Na matriz extracelular, o versican pode estar associado com várias moléculas incluindo tenascina, fibulina-1, fibrilina, fibronectina, CD44, L-selectina e β 1-integrina (BODE-LESNIEWSKA et al., 1996; ASPBERG et al., 1999; WU et al., 2004; WU et al., 2005). Normalmente, a interação do versican com elementos da matriz extracelular garante a integridade do tecido e ainda regula a proliferação e diferenciação das células (SHENG et al., 2006).

Nos tumores epiteliais malignos, pesquisas evidenciam a estreita relação existente entre a superexpressão de versican e capacidade infiltrativa adquirida pelas células neoplásicas (SUWIWAT et al., 2004; RICCIARDELLI et al., 2007; YEE et al., 2007; SKANDALIS et al., 2011). A deposição desta molécula na região peritumoral tem sido associada ao grau histológico, assim como à invasão local, angiogênese e metástase em carcinomas de mama na mulher (SUWIWAT et al., 2004; YEE et al., 2007). Este proteoglicano também é altamente expresso em estroma adjacente às áreas invasoras quando comparadas às áreas carcinomatosas *in situ* em neoplasias epiteliais mamárias caninas, indicando uma relação deste proteoglicano com invasividade nestes tumores (ERDÉLYI et al., 2003; DAMASCENO et al., 2012).

Alguns pesquisadores acreditam que esta motilidade adquirida pelas células neoplásicas seja proveniente da ligação do versican com o ácido hialurônico e da interação destes com os receptores de superfície celular CD44 e receptor de fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR), formando um complexo capaz de desencadear mecanismos de sinalização intracelular que regulam a proliferação e migração das células neoplásicas na matriz extracelular (HERNANDEZ et al., 2011; WEEN; OEHLER; RICCIARDELLI, 2011). Os mecanismos que regulam estas vias de sinalização ainda são pouco elucidados.

Deste modo, a pesquisa da presença do proteoglicano sulfatado versican, no estroma, bem como sua relação com progressão, características clinico-patológicas e receptores de superfície celular, tais como receptores de fator de crescimento epidérmico e CD44, poderá contribuir no entendimento dos fatores que culminam na transformação e progressão dos tumores produtores de matriz na glândula mamária canina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Matrix-extracelular e câncer

A iniciação, a progressão do câncer e a metástase são processos que envolvem complexas etapas afetadas tanto pelas características das células tumorais quanto do microambiente em torno do tumor. A matriz extracelular (MEC) está envolvida em ambos aspectos, exercendo funções relevantes que contribuem ativamente para várias etapas do desenvolvimento tumoral (HU; POLYAK, 2008; DU; YANG; YEE, 2013). Especialmente durante a invasão, pré-requisito crucial para a metástase, a matriz desempenha o importante papel ao criar um microambiente favorável à migração das células neoplásicas (LIOTTA e KOHN, 2001; KISCHEL et al., 2010; CANAVESE et al., 2011). Estas modificações no estroma são reflexos das alterações sofridas pelas células neoplásicas, que perdem a expressão de moléculas de adesão, alteram sua capacidade fixação, induzem a degradação e migram através dos componentes da matriz (LIOTTA e KOHN, 2001; RICCIARDELLI et al., 2009; UNGEFROREN et al., 2011).

A participação da MEC também é importante durante o processo de formação de metástases que pode ser dividido em várias etapas: a emigração a partir do tumor primário, invasão do tecido circundante e da sua matriz extracelular; o extravasamento para a circulação ou para o sistema linfático através da transmigração do revestimento endotelial e da membrana basal; e finalmente extravasamento e formação de metástases no sítio alvo. Durante cada fase, as células tumorais agem a partir do envolvimento de enzimas degradantes da matriz e processos mecânicos, tais como a adesão celular, movimento celular e a motilidade, além da geração de forças. Desta forma, somente é possível compreender o processo de invasão quando é possível ter uma visão detalhada das interações entre célula neoplásica e microambiente tumoral (UNGEFROREN et al., 2011). Entender como a matriz extracelular é constituída e como participa no crescimento normal e anormal é fundamental para compreender o câncer (ERDÉLYI, 2006).

2.1.1 Composição e função da matriz extracelular

A matriz extracelular é um complexo de macromoléculas que conectam-se por ligações não covalentes. É constituída predominantemente por colágeno, glicoproteínas

colagenosas, elastina, ácido hialurônico e proteoglicanos. Entretanto esta matriz não é apenas um arcabouço para as células de um determinado tecido, também serve como um reservatório para os fatores de crescimento e citocinas, além de modular o seu estado de ativação (KRESSE et al., 2001).

Existem cada vez mais evidências de que as moléculas da matriz extracelular podem apresentar uma função de sinalização direta, seja por meio de interações com receptores da matriz, como integrinas, ou por sinalização com receptores de fator de crescimento (YAMAGUCHI et al., 2000; KRESSE et al., 2001; RUTNAM et al., 2013) e iniciar uma cascata de sinalização capaz de controlar a sobrevivência e proliferação celular. A remodelação de MEC é essencial durante a angiogênese, morfogênese de glândulas e na cicatrização de feridas, assim como no processo de invasão das neoplasias malignas (NABA et al., 2015).

Os fatores que controlam a composição da matriz extracelular, assim como a organização e disponibilidade de seus componentes são cruciais para a condução de eventos celulares que culminam em processos patológicos (RUTNAM et al., 2013). Estudos mais recentes têm revelado que a ECM desempenha um papel funcional na progressão e disseminação tumoral (NABA et al., 2015). A deposição de ECM (ou desmoplasia), por exemplo, é um indicador de progressão tumoral e tem sido utilizado pelos patologistas como um marcador de prognóstico ruim (NABA et al., 2015).

2.1.2 Proteoglicanos

Proteoglicanos (PGs) podem ser classificados em três grupos com base nas propriedades de seu núcleo proteico, tamanho, localização e a composição molecular de suas cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) (YAMAGUCHI, 2000; THEOCHARIS et al., 2010; SCHAEFER, 2014). O primeiro grupo, PGs modulares, compartilham de uma característica comum que permite a montagem de vários módulos de proteína em uma única estrutura. Este grupo pode ser ainda subdividido em PGs ligados ao ácido hialurônico (AH) conhecidos como hialectanos (por exemplo, agrecan, versican, brevican e neurocan) e PGs não vinculados ao ácido hialurônico (por exemplo perlecan, colágeno XVIII). Hialectanos tem a capacidade de ligar AH através da sua extremidade globular N-terminal (G1), o domínio central que transporta a maior parte das cadeias de GAG e

exibe uma atividade semelhante à lectina localizado no domínio globular C terminal (G3) (THEOCHARIS et al., 2010).

O segundo grupo, pequenos proteoglicanos ricos em leucina são caracterizados pela presença de repetidas unidades de leucina em sua estrutura primária e são ainda subdivididas em cinco classes distintas (I, II, III, IV e V)(NASTASE; IOZZO; SCHAEFER, 2014). A decorina e biglicano são exemplos de pequenos proteoglicanos ricos em leucina. O último grupo, PGs de superfície celular, são segregados que incluem os sindecans e glicicans. Serglicina é uma exceção, pois é um PG intracelular capaz de transportar heparina (SCHAEFER, 2014).

Os PGs interagem com receptores que regulam o crescimento, motilidade e resposta imune. Como consequência da sua estrutura complexa, PGs podem se ligar a várias famílias de receptores e também pode interagir com ligantes de receptores naturais, frequentemente bloqueando e interferindo na sua atividade. Em sua forma solúvel, originados de qualquer processamento proteolítico parcial ou através de síntese pelas células ativadas, alguns proteoglicanos podem tornar-se potentes sinais de perigo, revelando estresse tecidual e lesões (FREY et al., 2013; NASTASE et al., 2014).

Durante a progressão do câncer, existem inúmeras evidências de que os proteoglicanos desempenham um papel importante nas interações de adesão célula-ECM (CATTARUZZA et al., 2008). Destes proteoglicanos, vários estudos têm demonstrado que versican (também conhecido como CSPG2 ou VCAN), um proteoglicano de sulfato de condroitina (CS), possui propriedades anti-adesivas e a capacidade de modular proliferação e migração em diferentes tipos de células, incluindo osteoblastos, astrócitos e miócitos, além de vários fibroblastos teciduais (RICCIARDELLI et al., 2009; DU et al., 2013).

2.1.3 Versican

2.1.3.1 Estrutura e função do versican

Versican é um proteoglicano de sulfato de condroitina e um dos principais componentes da MEC, expressos em quase todos os tecidos. VCAN desempenha um papel no desenvolvimento do tecido normal, altamente expresso durante a embriogênese de

diversos órgãos e mantem-se presente na matriz de vários tecidos maduros, incluindo músculo liso, cartilagem, coração, vasos sanguíneos, pele e sistema nervoso central (BODE-LESNIEWSKA *et al.*, 1996; RICCIARDELLI *et al.*, 2002; WIGHT, 2002; CHOOCHEEP *et al.*, 2010; DU *et al.*, 2013).

Estruturalmente, o proteoglicano versican é codificado por um único gene e está localizado no cromossomo 5q 12-14 no genoma humano. O gene humano VCAN é dividido em 15 exons de 90-100 kb (NASO *et al.*, 1994). Versican foi inicialmente identificado no meio de cultura de fibroblastos pulmonares humanos IMR-90 e apresenta uma massa molecular de 900 kDa. Esta proteína contém vários domínios ativos, sendo constituída por um domínio N-terminal (G1), que se liga 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. O domínio central constituído por duas cadeias de GAG está localizado entre os domínios G1 e G3 (ZIMMERMANN; RUOSLAHTI, 1989; MATSUMOTO *et al.*, 2003; RICCIARDELLI *et al.*, 2009).

Técnicas de biologia molecular têm demonstrado que os padrões de splicing do RNAm de versican podem gerar quatro isoformas, designadas v0, v1, v2 e v3 (NASO *et al.*, 1994; WU *et al.*, 2005; FREY *et al.*, 2013), que originam proteínas de 370, 262, 179 e 71 kDa, respectivamente (KISCHEL *et al.*, 2010). V0, a maior isoforma, contém duas cadeias de GAG designadas como GAG- α (12-17 cadeias laterais de CS) e GAG- β (5-8 cadeias laterais de CS). Em contraste, V1 compreende o domínio único de GAG- β , enquanto que V2 contém somente GAG- α . Os domínios GAG- α e GAG- β são ambos ausentes na isoforma V3 e, conseqüentemente, esta isoforma atua como uma glicoproteína e não como um proteoglicano. Todas as isoformas de versican contêm domínios globulares nas extremidades amina terminal (G1) e carboxi terminal (G3) (ZIMMERMANN e RUOSLAHTI, 1989; WEIDLE *et al.*, 2011).

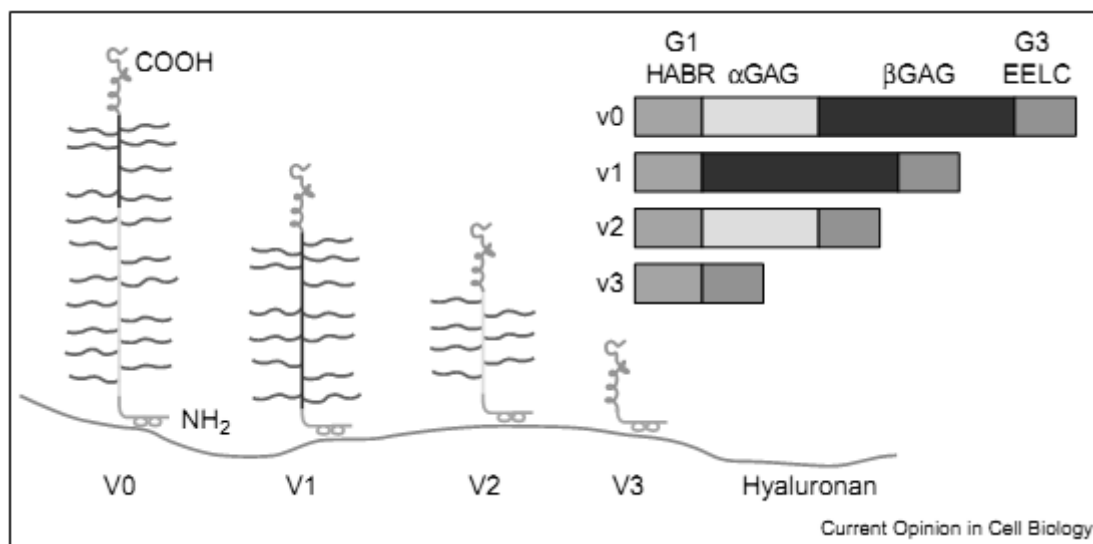


Figura 1. Diagrama esquemático das isoformas de versican

Fonte: Wight, 2002.

Existem poucas informações sobre distintas funções das isoformas de versican (RICCIARDELLI et al., 2009). A expressão dessas variantes em tecido normal e neoplásico de humanos tem sido investigada (SHENG *et al.*, 2005; KISCHEL *et al.*, 2010). No entanto, informações sobre seus níveis de expressão proteica e quais suas funções em diferentes tecidos e doenças permanecem escassas (KISCHEL *et al.*, 2010). Sabe-se que estas variantes de versican podem atuar realizando a ligação entre moléculas da matriz e célula além de desempenhar um papel central na montagem da matriz pericelular (ERDÉLYI, 2006).

Na matriz extracelular, o versican pode estar associado com várias moléculas incluindo tenascina, fibulina-1, fibrilina, fibronectina, CD44, L-selectina e β 1-integrina (BODELESNIEWSKA *et al.*, 1996; ASPBERG *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2005; RICCIARDELLI et al., 2009). Normalmente, a interação do versican com elementos da matriz extracelular garante a integridade do tecido e ainda regula a proliferação e diferenciação das células (SHENG *et al.*, 2006).

2.1.3.2 Regulação da expressão de versican

O gene versican é um alvo de várias vias de sinalização, incluindo as vias fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K / PKB), sonic hedgehog e Wnt canônica (WEIDLE et al., 2011). Ensaios

in vitro e *in vivo* demonstram que versican pode ser ativado pelo supressor tumoral p53 (YOON et al., 2002). Receptores tirosina-quinase (RTK) e várias citocinas, como TGF- β , PDGF, IL-1 α and IL-1 β , também podem interferir na expressão deste proteoglicano (RICCIARDELLI et al., 2009; DU et al., 2013).

A síntese de versican também é regulada por microRNAs (miRNA) (RNAs não codificantes, de 19 a 24 nucleotídeos, descritos por regularem a expressão gênica ao nível pós-transcricional). miR-199 atua no silenciamento pós-transcricional gênico ao se ligar a região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNAm de versican, levando a repressão translacional dessa molécula. Este microRNA é considerado um onco-supressor, tendo como alvo moléculas envolvidas na promoção do crescimento tumoral, sendo frequentemente regulado negativamente nos tumores malignos (LEE et al., 2009; THEOCHARIS et al., 2010)

2.1.3.3 Versican e câncer

O papel do versican na matriz extracelular neoplásica parece confuso e até mesmo contraditório (WU et al., 2005). Todavia, a importância desta molécula deve-se a sua participação na progressão, adesão, proliferação, diferenciação celular e angiogênese (PUKKILA et al., 2004; WU et al., 2004; ZHENG et al., 2004; ERDÉLYI et al., 2005; WU et al., 2005; YEE et al., 2007; KISCHEL et al., 2010).

As isoformas V0 e V1 estão predominantemente expressas em tecidos neoplásicos (RICCIARDELLI et al., 2009). Diferenças na estrutura entre elas indicam que o domínio central de V1, GAG (β), provavelmente está envolvido no aumento da proliferação celular, resistência a apoptose, além de regular a expressão de proteínas da família das caderinas, induzindo a epitelização de células fenotipicamente mesenquimais. Em contrapartida a isoforma V2, que possui domínio central GAG (α), é responsável por inibir o efeito proliferativo em modelos experimentais, além de ser questionado seu efeito na transição endotélio-mesenquimal no desenvolvimento de aorta embrionária. Aparentemente, o domínio β é necessário para ativação de EGFR pela isoforma V1, ao contrário do domínio α que atua desregulando este receptor (SHENG et al., 2005; SHENG et al., 2006).

A menor das variantes (V3) apresenta apenas os domínios amino (G1) e carboxi (G3) terminal e ausência das cadeias de sulfato de condroitina. Isto distingue consideravelmente esta isoforma das outras quanto as suas propriedades (RICCIARDELLI *et al.*, 2009). Em um estudo com melanoma, Miquel-Serra *et al.* (2006) observaram que a superexpressão da isoforma V3 apresentava um duplo papel. Por um lado, essa variante é capaz de reduzir a taxa de crescimento do tumor induzindo a apoptose das células, por outro favorece a migração das células no estroma por interação com o ácido hialurônico presente na matriz.

Kischel e colaboradores (2010) identificaram uma nova isoforma, denominada V4, secretada e regulada por fibroblastos na glândula mamária humana em resposta ao TGF- β 1. A função desta nova variante ainda é incerta, entretanto os níveis de expressão de RNAm e da proteína V4, assim como as outras isoformas, mostraram-se elevados nas lesões mamárias malignas, apontando seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral (KISCHEL *et al.*, 2010).

Os domínios G1 e G3 diferencialmente controlam a taxa de crescimento do tumor e têm papéis interativos na promoção do desenvolvimento de tumores e metástases. O domínio G1 do versican estimula a proliferação por desestabilizar a adesão celular, enquanto que o domínio G3 induz a proliferação, pelo menos em parte, a partir da ativação do EGFR por ação do domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF) (THEOCHARIS *et al.*, 2010).

Nos tumores epiteliais malignos, pesquisas evidenciam a estreita relação existente entre a superexpressão de versican e capacidade infiltrativa adquirida pelas células neoplásicas (SUWIWAT *et al.*, 2004; RICCIARDELLI *et al.*, 2007; YEE *et al.*, 2007; SKANDALIS *et al.*, 2011). Esta motilidade é proveniente da ligação do versican com o ácido hialurônico e da interação destes com os receptores de superfície celular CD44 e EGFR, formando um complexo capaz de desencadear mecanismos de sinalização intracelular que regulam a proliferação e migração das células neoplásicas na matriz extracelular (MIQUEL-SERRA *et al.*, 2006; HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; WEEN *et al.*, 2011). Ainda, tem sido demonstrado que o domínio C-terminal do versican é capaz de modular a associação de EGFR com a β 1- integrina e regular a proliferação celular (WU *et al.*,

2004). Entretanto, os mecanismos que regulam estas vias de sinalização ainda são pouco elucidados.

Em mulheres com câncer endometrial, os achados demonstram que pacientes que apresentam alta expressão de versican no estroma próximo ao processo neoplásico tem menor taxa de sobrevida (KODAMA *et al.* 2007), sugerindo que a avaliação da expressão de versican nestas lesões podem servir como indicador prognóstico. Mecanismos de motilidade e invasão promovidos pelo versican também foram observados em câncer ovariano. A ativação da cascata de sinalização do fator NF-kB, superexpressão de CD44, metaloproteinase-9 e receptores de (AH) são apontados como responsáveis por estes mecanismos de migração celular (THEOCHARIS *et al.*, 2015).

Nos carcinomas mamários, a deposição de versican nas áreas adjacentes ao tumor tem sido associada ao grau histológico e pode ser um forte fator preditivo de recidiva em mulheres linfonodo-negativo (SUWIWAT *et al.*, 2004). Além disso, sua maior expressão tem sido frequentemente associada à invasão local e angiogênese em carcinomas de mama na mulher (YEE *et al.*, 2007). Os mecanismos que alteram a expressão deste proteoglicano ainda são pouco elucidados, entretanto seu papel modulando perda de adesão e mobilidade celular também tem sido reconhecido em casos de metástases de câncer de mama (SUWIWAT *et al.*, 2004; YEE *et al.*, 2007).

Pesquisadores demonstraram que, em mulheres, a presença alterada do versican no estroma pode influenciar a proliferação e crescimento de células neoplásicas através dos domínios G1 e G3 e ainda facilitar a invasão com a supressão de V0 e V1 (TAKAHASHI *et al.*, 2012). Em contrapartida, acentuada expressão deste proteoglicano foi associada com elevada expressão de receptores hormonais, estrógeno e progesterona, pelas células neoplásicas e com alto grau de diferenciação (SKANDALIS *et al.*, 2011).

Trabalhos em cães avaliando a expressão de versican em adenomas e adenocarcinomas de cólon mostraram que sua intensidade aumenta quando associada às áreas de invasão carcinomatosas, indicando que alterações nos níveis deste proteoglicano induzem a progressão tumoral (MUKARATIRWA; NEDERBRAGT, 2002). Damasceno *et al.* (2012) observaram a expressão aumentada de versican nas áreas invasivas de carcinoma

em tumores mistos de mama de cadela, indicando o envolvimento deste proteoglicano na invasão de células neoplásicas, assim como os achados de Erdélyi *et al.* (2003).

Versican também pode promover um microambiente inflamatório no estroma tumoral (THEOCHARIS *et al.*, 2010). A interação entre versican e receptores do tipo toll 2 (TLR) pode ser um dos sinais de que inflamação e metástase estão relacionados (KIM *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). TLR-2 presente nas células endoteliais e fibroblastos ao se ligar com o versican induz a ativação destas células e a secreção de citocinas inflamatórias. Uma vez que a inflamação é frequentemente associada com iniciação e promoção de câncer, células inflamatórias (principalmente macrófagos) podem ser consistentemente consideradas como mediadores críticos no desenvolvimento de tumores malignos. Além disso, macrófagos podem induzir a angiogênese, degradação e remodelamento do MEC e assim promover invasão de célula neoplásicas (KIM *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009; THEOCHARIS *et al.*, 2010). Existem evidências de que versican também pode estar envolvido na polarização de macrófagos M1/M2 e, desta forma, regular o fenótipo destas células (FREY *et al.*, 2013).

Versican não só apresenta e recruta moléculas para a superfície celular, como também modula a expressão de genes e coordena complexas vias de sinalização (ERDÉLYI, 2006). Para isto, é necessário que haja uma interação desta molécula na matriz com importantes receptores de superfície celular, tais como CD44 e receptores de fator de crescimento epidérmico (Figura 2), os quais serão abordados em seguida.

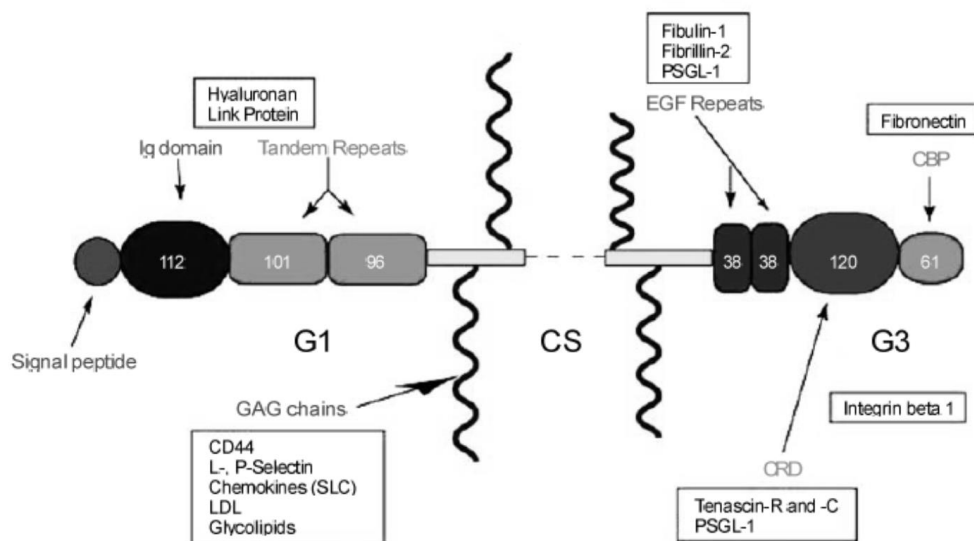


Figura. 2. Interação de versican e outras moléculas. A localização dos sítios de ligação do versican com outras moléculas

Fonte: Wu et al., 2005

2.1.3.4 Interação de versican com CD44

O CD44 é uma molécula de adesão, pertencente à família de glicoproteínas transmembranas que desempenha importante papel na migração celular, adesão célula-a-célula e nas interações célula-MEC (WEIDLE et al., 2011; et al., 2013). CD44 é codificada por um gene de 20 exons, sendo que os cinco primeiros e os cinco últimos são constantes e, 10 deles estão sujeitos a regiões variáveis com splicing alternativos de RNA nuclear (NAOR et al., 1997). As regiões de variabilidade podem gerar várias isoformas com diferentes estruturas e funções (GOTTE; YIP 2006). Esta molécula é composta por uma porção extracelular, uma transmembrana e uma intracelular que se liga às estruturas do citoesqueleto (ALLDINGER et al., 1999).

Esta glicoproteína pode interagir com ácido hialurônico e outros ligantes de MEC tais como versican, colagénos e osteopontina. Sua expressão tem sido intimamente relacionada com a progressão tumoral (KLINGBEIL et al., 2009). Em câncer de mama, a isoforma padrão de CD44 está envolvida na motilidade celular, invasão e aderência (AFIFY et al., 2009), conferindo potencial metastático às células neoplásicas (RUTNAM et al., 2013).

O CD44 atua como oncogene ou supressor tumoral. Sua função depende do ligante envolvido e das mutações inerentes ao tumor (WEIDLE et al., 2011). A função supressora exercida pelo CD44 é mediada por sua ligação ao ácido hialurônico e a subsequente formação de um complexo com merlin, uma proteína de citoesqueleto que inibe a sinalização para o núcleo e bloqueia o ciclo celular. Em contrapartida, CD44 induz o crescimento tumoral ao se ligar a fatores de crescimento, resultando em oligomerização e formação de um complexo com a ezrina, promovendo a sinalização para o núcleo e organização do citoesqueleto (BAI et al., 2007; WEIDLE et al., 2011).

As moléculas que se associam com versican, tais como CD44 e AH, também são regulados positivamente pelos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de crescimento tumoral 1 (TGF-1) e fator de crescimento epidérmico (EGF)

(EVANKO et al., 2001), causando superexpressão na matrix extracelular (DU et al., 2013). Em tumores de queratinócitos da epiderme, níveis de AH, CD44 e versican estão correlacionados a agressividade da doença (KARVINEN *et al.*, 2003). Interessantemente, tem sido demonstrado que versican também pode se ligar diretamente ao CD44 através das suas cadeias de GAG, independente da presença de AH (KAWASHIMA *et al.*, 2000; WU et al., 2005). Em câncer de próstata, foi observado que CD44, AH e versican formam um complexo capaz de promover motilidade, levando a invasão e metástase (RICCIARDELLI et al., 1998; 2007).

2.1.3.5 Interação de versican com receptores de fator de crescimento epidérmico

Receptores do fator de crescimento epidérmico (ErbB) pertencem a família dos receptores tirosina quinase e são representados por quatro membros: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3), e ErbB4 (HER4). Os membros desta família apresentam um domínio extracelular contendo um sítio de ligação, uma única hélice transmembranar hidrofóbica e um domínio citosólico que inclui proteína tirosina quinase (PTK), flanqueado por sequências reguladoras. Os ligantes de EGFR, tais como EGF, ligam-se aos seus receptores e induzem mudanças conformacionais que promovem a sua ativação (WU et al., 2005). Os fatores de crescimento também desencadeiam vias de sinalização intracelular que afetam a motilidade, proliferação e diferenciação celular (RUTNAM et al., 2013).

Uma multiplicidade de ligantes polipeptídicos extracelulares podem interagir com receptores ErbB. Numerosos fatores de crescimento têm sido descritos como ligantes dessa família e estes peptídeos são divididos em 4 grupos. Receptores de EGF se ligam a EGF, epigen, TGF e anfiregulina. Betacelulina, fator de crescimento ligante de heparina semelhante ao EGF e epiregulina se ligam a EGFR e ErbB4. O terceiro grupo incluem neuregulina-1 e 2 que se ligam a ErbB3 e ErbB4. O último grupo de ligantes a ErbB4 é constituído por neuregulina-3 e 4 (ROSKOSKI, 2014a; 2014b; APPERT-COLLIN et al., 2015). Destes membros, ErbB2 é o único que não tem ligação de alta afinidade com os ligantes conhecidos, no entanto, é o parceiro heterodimérico de outros EGFRs e funciona como um co-receptor (OLAYIOYE, 2001).

Versican também é capaz de interagir com receptores de EGF através de dois sítios semelhantes a EGF localizados no domínio G3 e estimular a proliferação celular (DU et al., 2013). A expressão de G3 além de está relacionada ao aumento de proliferação, também promove migração celular e metástase através da sinalização mediada por EGFR (ZANG et al., 1998; YEE et al., 2007; DU et al., 2010; 2011; 2013).

Em estudos com células mamárias, tem sido demonstrado que a interação de G3 e EGFR promove proliferação e migração, assim como formação de metástase espontânea em ossos em modelos ortotópicos (DU et al., 2010). Sítios de ligação semelhantes à EGF, presentes no domínio G3, aumentam sinalização de EGFR/ERK ou AKT conduzindo as células de câncer de mama a invadirem o estroma ósseo (DU et al., 2010; 2011). Este domínio também tem um papel na modulação de resistência a apoptose em células de câncer de mama tratadas com agentes quimioterápicos (DU et al., 2011).

Zhan e colaboradores (2006) mostraram que somente heterodímeros EGFR/HER-2 aumentam o potencial invasor de células epiteliais mamárias, o que não foi observado em homodímeros. Possivelmente, outros mecanismos estão envolvidos na ativação de destes receptores e nos seus efeitos na invasão celular (APPERT-COLLIN et al., 2015).

Formações de heterodímeros de EGFR e ErbB2 podem interagir com o proteoglicano versican. Hernández e colaboradores demonstraram que, em células de melanoma, a isoforma V3 pode interferir na interação entre AH e CD44 através do domínio G1, e competir com o ligante EGF através dos sítios semelhantes a EGF no domínio G3 ao se ligar com o o dímero EGFR/ErbB2. Aparentemente, V3 é capaz de interferir na via de ERK1/2 e p38 MAPK de forma dependente de EGF, desregulando sua ativação e diminuindo a capacidade de CD44 se ligar ao complexo EGFR-ErbB2 e, desta forma, afetando o crescimento e migração celular (HERNÁNDEZ et al., 2011). A relação de heterodímeros com outros componentes da família erbB, HER-3 e HER-4 e a expressão de versican não foi encontrado na literatura.

A superexpressão de versican no estroma e o remodelamento sofrido pela matriz extracelular podem ser mecanismos pelos quais as células tumorais controlem seu microambiente, promovendo invasão e desenvolvimento de metástases. O crescente interesse sobre este proteoglicano e o seu papel na progressão tumoral é justificado pela

busca de novos biomarcadores e de alvos terapêuticos mais eficazes no tratamento oncológico. Compreender a relação entre versican e receptores de superfície celular expressos em neoplasias espontâneas, na glândula mamária canina, pode contribuir no estudo sobre progressão tumoral.

2.2. Tumores mamários caninos: modelo para estudo do câncer

A busca por maior entendimento sobre os fatores responsáveis pelo desenvolvimento do câncer em humanos justifica o crescente interesse dos pesquisadores pelos modelos animais. Contudo, a disponibilidade destes modelos para o estudo dos tumores mamários na mulher representa um grande desafio na pesquisa do câncer de mama (UVA *et al.*, 2009).

Por compartilharem um ambiente comum com os seres humanos, os cães são frequentemente expostos a alguns dos mesmos agentes cancerígenos (KNAPP; WATERS, 1997). Adicionalmente, o tempo de vida mais curto dos cães em comparação com os seres humanos, facilita o estudo de tumores mamários, os quais se desenvolvem logo após alguns anos, ao invés de décadas como nas mulheres (UVA *et al.*, 2009). Além disso, as neoplasias mamárias caninas apresentam elevada frequência na rotina clínica dos animais de companhia (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

Uva e colaboradores (2009) mostraram que a relação transcricional entre assinaturas gênicas observadas no câncer mamário humano são largamente mantidas no modelo canino, sugerindo uma similaridade na rede de sinalização do câncer entre as espécies. Estes dados confirmam e fortalecem o valor do modelo de tumores mamários caninos e abrem novas perspectivas para estudo da progressão tumoral, avaliação das terapias do câncer e desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e de diagnóstico a serem usados em estudos clínicos humanos.

2.2.1. Tumores mistos da glândula mamária canina

2.2.1.1. Tumor misto benigno

Os tumores mistos benignos são neoplasias frequentes na mama da cadela e representam, de acordo com o atual sistema de classificação veterinária, de 40 a 50% dos tumores benignos nesta espécie (CASSALI *et al.*, 2011; 2014). Acometem cadelas entre três e 14 anos, sendo observado com maior frequência em animais de oito anos de idade (GENELHU *et al.*, 2007; BERTAGNOLLI *et al.*, 2011).

Histologicamente, são caracterizados por um padrão complexo constituído por componentes epitelial (células luminais), mioepitelial e mesenquimal como cartilagem, osso e gordura, em combinação com tecido fibroso. As células mioepiteliais em proliferação podem apresentar aspecto fusiforme ou estrelado, frequentemente embebidas em abundante matriz extracelular (matriz mixóide). A proliferação de células mioepiteliais associada à presença de matrix mixóide são precursores da cartilagem ectópica observada nos tumores mistos, sugerindo que a mesma resulta da transição (mio)epitelial-mesenquimal (MISDORP *et al.*, 1999; CASSALI *et al.*, 2014).

Em alguns casos de tumores mistos benignos e carcinomas em tumores mistos, a formação óssea está associada à presença de medula óssea (HELLMÉN, 2005), caracterizando uma metaplasia mielóide (GRANDI *et al.*, 2010; AULER *et al.*, 2011). Cerca de 4% dos tumores mistos apresentam esta característica (AULER *et al.*, 2011).

Em humanos, os tumores mistos benignos mamários são pouco frequentes, no entanto comumente diagnosticados nas glândulas salivares, onde são denominados tumores mistos ou adenomas pleomórficos (VOZ *et al.*, 2000). Estes também podem sofrer transformação maligna originando carcinomas ex-adenomas pleomórficos (LEWIS *et al.*, 2001). Nas duas espécies, fatores como tempo de crescimento e a recorrência apresentam relação com malignidade (MOULTON *et al.*, 1970; AUCLAIR; ELLIS, 1996; LEWIS *et al.*, 2001; FOWLER *et al.*, 2006). Ainda, similaridades na expressão de algumas moléculas como citoqueratinas, p63, vimentina, β -catenina e E-caderina e a mesma faixa etária de acometimento das lesões benignas e malignas sugerem patogênese semelhante destes tumores (GENELHU *et al.*, 2007).

Em tumores mistos caninos, assim como nos adenomas pleomórficos, a formação da matriz mixóide é constituída pela proliferação de células fusiformes, possivelmente de origem mioepitelial e por substância mixomatosa, além de matriz cartilaginosa e/ou óssea (MISDORP *et al.*, 1999; ERDÉLYI *et al.*, 2005). A histogênese dos elementos mesenquimais ainda permanece controversa (GAMA *et al.*, 2003; HELLMÉN, 2005).

2.2.1.2. Carcinoma em tumor misto

O carcinoma em tumor misto surge da transformação maligna epitelial em tumores mistos benignos (MOULTON *et al.*, 1970; MISDORP *et al.*, 1999). Estes são os tumores malignos mais freqüentes na glândula mamária da cadela, e representam cerca de 42% das neoplasias malignas (CASSALI *et al.*, 2009), podendo alcançar o percentual de 56,7%, segundo achados de Toríbio *et al.*, (2012).

Anteriormente, carcinomas em tumores mistos benignos eram designados tumores mistos malignos. Esta denominação também era aplicada aos carcinossarcomas e por isso eram considerados sinônimos (HAMPE; MISDORP, 1974). Este último tipo histológico apresenta malignidade nos componentes epitelial e mesenquimal, diferente do carcinoma em tumor misto benigno, em que somente células epiteliais são malignas (MISDORP *et al.*, 1999). Devido à distinção histológica, Misdorp *et al.* (1999) propôs que o termo tumor misto maligno fosse extinto e substituído por carcinoma em tumor misto benigno, atualmente o mais utilizado.

O carcinoma em tumor misto benigno e o carcinoma ex-adenoma pleomórfico, assim como suas contrapartes benignas, tumor misto benigno e adenoma pleomórfico respectivamente, apresentam diversas similaridades. Na espécie humana, o carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXPA) compreende aproximadamente 3,6% de todos os tumores de glândula salivar e cerca 12% de todas as neoplasias malignas de mesma localização (GNEPP *et al.*, 2005). Em geral, apresentam caráter agressivo e, assim como em caninos, o carcinoma ex-adenoma pleomórfico resulta da malignização do componente epitelial nos adenomas pleomórficos (AP) (MISDORP *et al.*, 1999; FOWLER *et al.*, 2006; KATORI *et al.*, 2007).

Similaridades clínicas, histopatológicas e antigênicas (para citoqueratinas, vimentina, β -catenina e E-caderina) entre tumores mistos de glândula salivar humana e de glândula mamária canina foram observadas (GENELHU *et al.*, 2007). Em estudo, Genelhu e colaboradores (2007) sugerem uma histogênese semelhante para estas neoplasias e propõe o uso dos tumores mamários caninos como modelo de estudo para tumores mistos de glândula salivar humana. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo de transformação maligna de ambos os tipos histológicos ainda são incertos (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2011).

O microambiente tumoral também pode estar ativamente envolvido na transição de AP para CXPA (ARAÚJO *et al.*, 2009). Análises por imuno-histoquímica tem demonstrado que o contato entre células tumorais e colágeno fibrilar tipo I, particularmente nas áreas invasoras pode estar associado com redução de E-caderina e β -catenina e com caráter invasivo dos CXPA (ARAÚJO *et al.*, 2009). Supõe-se ainda que proteínas da matriz extracelular, como laminina e colágeno IV, assim como deposição de tenascina estejam relacionadas à malignização (FÉLIX *et al.*, 2004).

Apesar da alta frequência dos carcinomas em tumores mistos benignos e das suas similaridades com os carcinomas ex-adenomas pleomórficos, ainda existem poucos estudos a respeito da progressão maligna das neoplasias mamárias caninas (BERTAGNOLLI *et al.*, 2011). Na década de 70, Moulton e colaboradores já levantavam a hipótese de que se os tumores mistos tivessem tempo suficiente para crescer, poderiam sofrer malignização (MOULTON *et al.*, 1970). Tempos depois, Genelhu *et al.* (2007) e posteriormente Bertagnolli *et al.* (2009) observaram alterações de proteínas que podem contribuir para transformação dos tumores mistos benignos, tais como a perda da expressão de p63, Δ Np63, E-caderina e β -catenina.

Bertagnolli e colaboradores (2011) observaram que a superexpressão de EGFR pelas células epiteliais malignas pode ser um evento precoce na carcinogênese dos tumores mistos. E ainda, alterações na expressão dessa molécula podem ser cruciais no processo de transformação maligna no componente epitelial deste tipo histológico.

2.3.1.3. Carcinossarcoma

Os carcinossarcomas são neoplasias pouco frequentes na mama da cadela e suas características clínicas e patológicas são semelhantes as descritas em humanos. Além disso, são tumores raros na mulher e tem um pior prognóstico quando comparados com outros tipos de carcinomas (TOKUDOME et al., 2005). Anteriormente, a denominação tumor misto maligno era utilizada para descrever tumores mistos com um ou ambos componentes (epitelial e mesenquimal) malignos. Entretanto, Misdorp e colaboradores (1973) observaram que a presença de elementos sarcomatosos assim como a maior frequência de metástases justificavam a separação em dois tipos histológicos, carcinomas complexos (ou carcinomas em tumores mistos) e carcinossarcomas. Similaridades morfológicas dificultam o diagnóstico diferencial entre estes tumores.

Atualmente, a denominação carcinossarcoma é utilizada para descrever tumores mistos com ambos os componentes, epitelial e mesenquimal malignos (MISDORP et al., 1999). O componente epitelial pode revelar padrões de crescimento e diferenciação bastante variáveis incluindo adenomatoso, sólido, escamoso, mucinoso e anaplásico. O componente sarcomatoso também pode variar de fibrossarcomatoso, condrossarcomatoso a osteossarcomatoso (MISDORP, 2002; CASSALI et al., 2014). A presença de matriz mixóide pode ser um indicador de que estes tumores são derivados de carcinomas em tumores mistos (MISDORP et al., 1973). A taxa de metástase é relativamente elevada em relação aos carcinomas em tumores mistos (CASSALI et al., 2014).

Alguns pesquisadores comparam carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas da cadela com carcinomas metaplásicos da mama da mulher, uma vez que estes tipos histológicos apresentam características morfológicas semelhantes (GENELHU et al., 2007; SASSI et al., 2008). Entretanto, não existem estudos comparando estes tipos histológicos entre as duas espécies.

2.2.2. Carcinoma metaplásico da mama humana

Carcinoma metaplásico da mama da mulher é um termo genérico para uma coleção heterogênea de tumores que apresentam componentes epiteliais entre componentes

mesenquimais, ou carcinomas escamosos primitivos dos elementos ductais, ou ainda adenocarcinoma com metaplasia escamosa (TSE et al., 2006). Estas neoplasias representam entre 0,2-5% de todos os carcinomas invasivos da mama (SCHWARTZ et al., 2013; WEIGELT et al., 2014). Os carcinomas metaplásicos frequentemente apresentam um prognóstico desfavorável e metástases são freqüentes, mesmo quando os linfonodos regionais não estão acometidos (LUINI et al., 2007).

Carcinoma produtor de matriz (WARGOTZ; NORRIS, 1989a), carcinoma de células fusiformes (WARGOTZ; DEOS; NORRIS, 1989b), carcinossarcoma (WARGOTZ & NORRIS, 1989c), carcinoma de células escamosas de origem ductal (WARGOTZ & NORRIS, 1990a) e carcinoma metaplásico com células gigantes osteoclasticas (WARGOTZ & NORRIS, 1990b) são os subtipos desta entidade. Uma variante do subtipo de carcinoma metaplásico de células fusiformes, chamado de “fibromatosis-like”, foi descrita por Gobbi e colaboradores (1999), entretanto estes autores observaram um prognóstico favorável, apesar das freqüentes recidivas locais.

Inicialmente, acreditava-se que estes tumores originassem de células tronco ou mioepiteliais (WEIGELT et al., 2014). Entretanto, o fenótipo do tumor pode ser fortemente influenciado pelo fenótipo da célula de origem e das aberrações genéticas sofridas (INCE et al., 2007). Outra justificativa para a existência de múltiplos padrões de fenótipo dos carcinomas metaplásicos seria a transição epitélio-mesenquimal (HENNESSY et al., 2009).

Os carcinomas metaplásicos apresentam amplificação e superexpressão para EGFR (REIS-FILHO et al., 2005), além de apresentarem um perfil imuno-histoquímico semelhante ao carcinoma do tipo “basal-like” (REIS-FILHO et al., 2006). Geralmente, estas neoplasias pouco expressam receptores hormonais, assim como o HER-2 (REIS-FILHO et al., 2005; TSE et al., 2006).

Diante das similaridades morfológicas apresentadas entre carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas na mama da mulher, os tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinossarcoma podem ser considerados bons modelos para estudo comparativo sobre progressão tumoral.

3. HIPÓTESES

A expressão de versican é mais acentuada em estroma adjacente às áreas epiteliais malignas invasoras e relacionada a maior expressão dos receptores de superfície celular CD44, EGFR, HER-2 e HER-3, assim como a maior expressão de *EGFR* e *HER-2* em células carcinomatosas invasoras.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão e a associação entre versican e os receptores de superfície celular CD44, EGFR, HER-2 e HER-3 em tumores produtores de matriz na glândula mamária canina.

4.1. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de versican, CD44, EGFR, HER-2 e HER-3 em áreas epiteliais normais e benignas em tumores mistos benignos pela técnica de imuno-histoquímica;
- Avaliar a expressão de versican, CD44, EGFR, HER-2 e HER-3 em áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras em carcinomas em tumores mistos benignos e carcinossarcomas pela técnica de imuno-histoquímica;
- Correlacionar a expressão de versican com a expressão dos receptores CD44, EGFR, HER-2 e HER-3 em áreas epiteliais normais, benignas, carcinomatosas *in situ* e invasoras em tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinossarcoma;
- Avaliar a expressão de RNAm de versican, EGFR e HER-2 em áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras em carcinomas em tumores mistos benignos e carcinossarcomas pela técnica de hibridização *in situ*;
- Correlacionar a expressão dos marcadores em imuno-histoquímica e com a expressão de RNAm expressos em carcinomas em tumores mistos benignos e carcinossarcomas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Espécimes mamários

O presente trabalho foi executado no Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram selecionados casos de tumores mamários caninos, disponíveis no Laboratório de Patologia Comparada/UFMG e Laboratório de Patologia Veterinária/UFBA, independente da raça ou idade. Além disso, as lesões mamárias obtidas de cadelas de várias raças, puras ou mestiças, que sofreram extirpação cirúrgica no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG e Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFBA, durante o período do doutorado, também foram inseridas no estudo.

5.2 Estadiamento (TNM)

Foi realizado o estadiamento clínico com base no tamanho do tumor (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), de acordo com o sistema TNM estabelecido pelo *World Health Organization* (WHO) para tumores mamários caninos (modificado de OWEN, 1980)(ANEXO 1). Estes dados foram obtidos das fichas clínico-patológicas de cada animal.

5.3 Histopatologia

Secções histológicas de 4µm foram obtidas dos fragmentos mamários fixados em formol neutro tamponado com fosfato a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina (LUNA, 1968) e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina. O grupo de estudo foi composto por tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos benignos e carcinossarcomas. A identificação do tipo histológico seguiu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (MISDORP et al, 1999) e padronização do *Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors* (CASSALI et al., 2011; 2014).

5.4 Graduação histopatológica

Os tumores foram graduados pelo Sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS, 1998), e os critérios incluirão formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica. As estruturas tubulares foram definidas como aquelas que apresentaram lúmen claro e visível. O escore 1 foi atribuído aos tumores que apresentaram mais de 75% da área carcinomatosa formada por túbulos; escore 2 entre 10% - 75% e escore 3 entre 0 - 10% da área do tumor. Para análise de pleomorfismo nuclear, foi observado tamanho e forma dos núcleos das células epiteliais normais adjacentes ao tumor, sendo utilizado como parâmetro. Escore 1 foi atribuído para núcleos pequenos e regulares e cromatina uniforme. Quando os núcleos que apresentaram tamanho aumentado e com variabilidade foi dado escore 2. A presença de células com acentuado pleomorfismo, com grande variação no tamanho e forma do núcleo, apresentando ainda núcleos bizarros e vesiculosos, com múltiplos nucléolos caracterizaram o escore 3. A contagem mitótica foi realizada por dois observadores de forma individualizada, sendo o resultado final obtido a partir da média dos valores. Foi utilizado o microscópio BX-41 com ocular de 10x e objetiva de 40x. Este equipamento fornece uma área de 0,237 mm visualizada em campo de maior aumento (CGA). As figuras mitóticas foram contadas em 10 CGA, selecionados preferencialmente na periferia do tumor onde se observa maior atividade de proliferação celular (ELSTON e ELLIS, 1998). O escore foi atribuído de acordo com o número de mitoses detectadas: escore 1 (0-8 mitoses); escore 2 (9-16 mitoses) e escore 3 (acima de 17 mitoses). Núcleos picnóticos ou hiper cromáticos não foram contados uma vez que estas células podem estar relacionadas com processos de necrose ou apoptose (ANEXO 2).

Para a obtenção do grau histológico combinado do tumor, o escore para cada fator foi somado, resultando em um valor total que varia de 3 a 9. O grau tumoral foi alocado baseado nos valores a seguir:

3 – 5 pontos: grau I – baixo grau;

6 – 7 pontos: grau II – grau intermediário;

8 – 9 pontos: grau III – alto grau.

5.5 Imuno-histoquímica

Para a imuno-histoquímica, os anticorpos primários que foram utilizados estão listados na tabela a seguir:

Tabela 1. Lista de anticorpos

ANTICORPO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Versican</i>	12C5	DSHB, Iowa City, IA, US	1:50	Erdelyi et al., 2003
<i>CD44</i>	2D10	Dr. Kremmer, Munich, Germany	1:200	Paltian et al., 2009
<i>EGFR</i>	31G7	Invitrogen	1:100	Bertagnolli et al., 2011
<i>HER-2</i>	Polyclonal	Dako, Denmark	1:200	Bertagnolli et al., 2011
<i>HER-3</i>	Policlonal	GeneTex	1:200	Kim et al., 2011

Para esta técnica, secções de 4µm foram obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas gelatinizadas. As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, e submetidas à recuperação antigênica em calor-úmido (banho-maria a 95° por 20 minutos) com tampão citrato (Target Retrieval Solution), pH 6.0, exceto as lâminas destinadas a marcação de versican. Nestas foi realizado tratamento enzimático por meio de condroitinase ABC. Posteriormente todas as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com soro normal de coelho a 10% em PBS por 15 minutos.

As secções histológicas foram incubadas com o anticorpo primário por 1 hora a 25°C e na sequência aplicado o método de revelação polimérica (ADVANCE HRP–ready to use–DakoCytomation). Por último, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina e contra-coradas com hematoxilina de Mayer’s. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS.

5.5.1 Avaliação imuno-histoquímica

A expressão de versican no estroma das áreas adjacentes a proliferação epitelial maligna *in situ* e invasora foi avaliada de forma semiquantitativa baseado no sistema de escore proposto por Skandalis et al. (2011), o qual inclui (i) a porcentagem total de tecido positivamente marcado (0-100%), e (ii) a intensidade de marcação para o proteoglicano. De acordo com a escala, (1) é considerado negativo ou fracamente marcado, (2) positivo fraco, (3) positivo moderado e (4) positivo forte. O grau de expressão de versican foi então dado pela multiplicação da porcentagem (0-100%) pela intensidade (1-4).

Avaliação semiquantitativa também foi realizada na análise da expressão de CD44 nas áreas de glândula normal e neoplásica. Assim, foi observada a intensidade de marcação: (0) sem marcação; (1) fraca marcação; (2) moderada marcação; (3) intensa marcação; além da quantidade estimada de células marcadas: (0) nenhuma área reativa; (1) de 1 a 25% das células positiva; (2) 26 a 50% das células positivas; (3) 51 a 75% das células positivas; (4) >75% das células positivas. O escore foi calculado pela multiplicação da intensidade pela quantidade de células imunorreativas. Escore abaixo de 3 foi considerado “baixo”, entre 4 e 6 “moderado”, entre 7 e 9 “alto” e escore 10 como “muito alto” (PALTIAN et al., 2009). Foi avaliada a expressão desta molécula nas áreas epiteliais benignas, áreas de proliferação epitelial maligna *in situ* e invasora, assim como nas áreas de proliferação de células mioepiteliais e mesenquimais.

A expressão de EGFR e HER-2 foi avaliada em células epiteliais utilizando-se escores definidos segundo o consenso da *American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists* (ASCO/CAP)(WOLFF et al., 2013) e adaptado de Bertagnolli et al. (2011): -, ausência de marcação; 1+, marcação membranar incompleta fraca em mais de 10% das células tumorais; 2+, marcação membranar incompleta e/ou fraca a moderada em mais de 10% das células tumorais ou marcação completa e forte em menos de 10% das células tumorais; 3+ completa e intensa em pelo menos de 10% das células tumorais.

A expressão de HER-3 foi avaliada em membrana, citoplasma e núcleo das células epiteliais e estratificadas em quatro grupos: alta expressão (3+, >35%), moderada

expressão (2+, 18– 35%), baixa expressão (1+, 1–17%), ausência de expressão (0, 0%) (adaptado de KIM *et al.*, 2011).

5.6 Microscopia confocal de fluorescência

No intuito de mensurarmos a marcação não nuclear de EGFR e HER-2, foram selecionados 15 casos de carcinomas em tumores mistos e 8 casos de carcinossarcomas, os quais apresentaram baixa ou alta expressão de versican no estroma adjacente às áreas invasoras. A técnica de imunofluorescência foi realizada segundo descrito previamente (RODRIGUES *et al.*, 2015). Foram realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura de blocos de parafina contendo amostras tumorais. As lâminas foram duplamente incubadas com anticorpo primário contra a proteína EGFR (31G7, Zymed, 1:100) e citoqueratina (AE1/AE3/Alexa Fluor 488, Affimetrix, 1:250) ou com anticorpo primário contra HER-2 (policlonal, Dako, 1:100) e citoqueratina (AE1/AE3/Alexa Fluor 488, Affimetrix, 1:250). Posteriormente os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado a Alexa 555 e com sonda de núcleo fluorescente Hoechst (1µg/mL, Invitrogen). As imagens foram coletadas em microscópio confocal Zeiss LSM 5 Live usando objetiva de imersão em óleo de 40x, N.A. de 1.3, pinhole foi mantido abaixo de 2µm, com excitação de 488 nm e observação a 500-525 nm para detectar Alexa 488, excitação de 543 e observação acima de 550 nm para detectar Alexa 555 e excitação a 405 nm e observação a 415–480 nm para detectar a sonda nuclear Hoechst. As análises foram realizadas usando o software ImageJ, no qual foi avaliada a intensidade de marcação não nuclear de EGFR e HER-2 nas áreas carcinomatosas *in situ* e invasoras dos carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas. Para isso, em cada imagem capturada foi selecionada uma determinada área (carcinomatosa *in situ* ou invasora) e foram excluídas as áreas nucleares. O valor obtido da intensidade de marcação total foi dividido pelo valor de toda a área citoplasmática.

5.7 Hibridização *in situ* de RNAm

A técnica de hibridização *in situ* de RNAm foi realizada como previamente descrito por Alves *et al.*, (2014), utilizando o kit RNAscope 1.0 and 2.0 FFPE Assays (Advanced Cell Diagnostics, Inc.). Para isto, foram realizadas secções histológicas de 4 µm das amostras previamente fixadas em formol e processadas pela técnica de inclusão em parafina. As

lâminas histológicas foram inicialmente imersas em solução pre-tratamento a 100-104°C durante 15 minutos. Na sequência, as secções foram submetidas a tratamento enzimático com pepsina a 40°C em hibridizador (HybEZ hybridization oven, Advanced Cell Diagnostics, Inc., Hayward, California). Sondas específicas para os RNAm de versican, EGFR e HER-2 caninos foram utilizadas e mantidas em contato com o tecido por 2 horas à 40°C com o intuito de hibridizarem nos RNAm-alvo. Em seguida, foram realizadas as etapas de pré-amplificação e amplificação, para posterior revelação utilizando o coromógeno diaminobenzidina (DAB) e contracoloração com hematoxilina de Gill's.

Os ensaios utilizando amostras FFPE foram realizados em paralelo com controles positivos e negativos. As reações visualizadas em microscopia óptica. A avaliação foi semiquantitativa realizada segundo orientações do fabricante, que define 5 escores: (0) – sem marcação ou menos que 1 ponto a cada 10 células (aumento de 60X) (1+) - 1–3 pontos/célula (visível em aumento de 20–60X), (2+) - 4–10 pontos/célula e poucos pontos aglomerados (visível em aumento de 20–60X), (3+) - > 10 pontos/célula e menos que 10% das células positivas apresentando pontos aglomerados (visível em aumento de 20–60X) e (4+) - >10 pontos/célula e mais que 10% das células positivas apresentando pontos aglomerados. Somente a marcação citoplasmática foi considerada.

5.8 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. Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson. Foram consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste for $p < 0,05$. Para verificar se as variáveis diferiram entre os grupos (com alta e baixa expressão de versican), foi utilizado o Teste Mann Whitney (dados não paramétricos). A diferença da expressão de versican, EGFR, HER-2, HER-3 e CD44 entre áreas *in situ* e invasoras foi avaliada pelo teste de Wilcoxon. As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Graph Pad InStat v. 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFMG) sob protocolo nº 0053/11 (ANEXO 3).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos elaborados (publicado e submetido para publicação) durante o período de doutoramento.

ARTIGO 1

Relationship between the expression of Versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix producing tumours in the canine mammary gland

Publicado no periódico *Histology and Histopathology*, dezembro de 2015

ARTIGO 2

***HER-2* and *EGFR* mRNA Expression and Its Relationship
with Versican in Malignant Matrix-Producing Tumours of
the Canine Mammary Gland**

Publicado no periódico PLOS One em agosto de 2016

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O estroma adjacente às áreas epiteliais benignas apresentou discreta expressão de versican enquanto que nas áreas normais não foi observada a presença deste proteoglicano;
- A expressão de versican está relacionada a invasividade em carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas da glândula mamária canina;
- Cadelas diagnosticadas com tumores mistos benignos, carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas apresentam diferenças significativas quanto a idade no momento do diagnóstico e quanto ao tamanho das neoplasias;
- Cadelas diagnosticadas como carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas apresentam diferenças significativas quanto a presença de metástase em linfonodo regional, metástase à distância e grau histológico indicando o carácter mais agressivo de carcinossarcomas em relação aos carcinomas em tumores mistos;
- Cadelas pertencentes aos grupos de alta e baixa expressão de versican, tanto de carcinomas em tumores mistos quanto de carcinossarcomas, não diferiram estatisticamente quanto às características clínico-patológicas;
- Os receptores de superfície celular EGFR, HER-2 e CD44 foram mais expressos em células carcinomatosas *in situ* em relação as células invasoras em carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas da glândula mamária canina;
- A expressão de HER-2, HER-3 e CD44 em áreas carcinomatosas invasoras foi significativamente maior em tumores agressivos (carcinossarcomas) que também apresentavam superexpressão de versican em estroma adjacente;
- Áreas carcinomatosas *in situ* revelaram maior expressão de *EGFR* e *HER-2* em carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas, assim como os resultados observados na expressão das proteínas, sugerindo a participação dessas moléculas na fase inicial de progressão tumoral;
- Não foi observada relação entre expressão de *EGFR* e *HER-2* com a expressão de versican;

- A expressão de RNAm dos genes estudados, *EGFR* e *HER-2*, não apresentou correlação significativa com resultados na análise imuno-histoquímica.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Significativos avanços tem sido observados no estudo da matriz extracelular e sua composição no intuito de compreender as mudanças sofridas por ela diante dos processos patológicos. Na oncologia, não é diferente. A MEC tem um importante papel no desenvolvimento tumoral, criando um microambiente favorável a invasão, facilitando o recrutamento de células inflamatórias, participando ativamente da angiogênese e colaborando para migração de células neoplásicas e estabelecimento das metástases. Isso porque, ela interage direta ou indiretamente com as células cancerosas e é capaz de responder aos estímulos induzidos por elas. Além disso, componentes da matriz também estimulam vias de sinalização que culminam em maior proliferação, sobrevivência celular, resistência a apoptose, perda de adesão e motilidade, características estas que colaboram fortemente para a progressão tumoral. A presença de proteoglicanos, como o versican, e seu papel nessa complexa rede de vias de sinalizações que culminam no microambiente favorável a progressão e desenvolvimento tumoral instigam cada vez mais novas pesquisas.

Acreditamos que os tumores mistos mamários caninos podem servir como modelo de progressão tumoral e por isso foram escolhidos como objeto deste estudo. Estes são tumores caracterizados pela proliferação benigna de componentes epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais, revelando a presença de matriz mixóide, osteóide e ou condróide. A medida que evoluem, os componentes epiteliais podem sofrer transformações malignas e assim constituir os chamados carcinomas em tumores mistos. Quando estes tumores apresentam apenas células mioepiteliais reativas, sem que haja a presença de matriz mixóide bem definida, também podem ser chamados de carcinomas complexos. Uma outra entidade de tumores mistos, o carcinosarcoma, é definido pela proliferação maligna dos componentes epiteliais e mesenquimais, por vezes apresentando componentes mioepiteliais associados. Diante dessa característica, Moulton e colaboradores (1970) sinalizaram a possibilidade de que carcinosarcomas, antigamente conhecidos por tumores mistos malignos, tenham uma origem em comum com carcinomas complexos. As características morfológicas apresentadas pelos três subtipos

histológicos nos impulsionam a estudar e tentar elucidar os mecanismos envolvidos na progressão destes tumores.

Dando continuidade aos estudos iniciados durante o mestrado, este trabalho investiga a participação do versican no processo de progressão tumoral. Inicialmente, nós verificamos que a superexpressão desta molécula estava diretamente relacionada a invasividade em carcinomas em tumores mistos. A partir disso, surgiram novos questionamentos. Como essa molécula se comportava em tumores mistos benignos e carcinossarcomas? Havia diferença na sua expressão entre áreas normais, benignas, carcinomatosas *in situ* e invasoras? Existe relação deste proteoglicano com receptores de superfície celular? Quais as possíveis vias de sinalização desencadeadas a partir destas interações?

No presente estudo, foi possível observar significativas diferenças na expressão do proteoglicano entre áreas normais e benignas, assim como entre áreas *in situ* e invasoras nos tumores estudados. A presença deste proteoglicanos em estroma adjacente às áreas epiteliais benignas em tumores mistos benignos sugerem que modificações na MEC são induzidas desde os estágios iniciais da transformação tumoral. Além disso, a superexpressão desta molécula nas áreas invasoras reforça a hipótese da sua participação durante a invasão tumoral.

A relação entre versican e receptores de fator de crescimento epidérmico também foi observada. A superexpressão de versican em estroma e uma maior expressão de HER-2 membranar e HER-3 citoplasmático em células carcinomatosas invasoras sugerem que estas moléculas podem interagir, direta ou indiretamente nessa fase de progressão tumoral. Entretanto, não foi possível observar esta relação com EGFR, contradizendo os achados da literatura. Possivelmente, durante a fase de invasão celular, fatores relacionados a proliferação estejam diminuídos ou silenciados e fatores relacionados a invasão sejam superexpressos. Sabe-se que os receptores de fator de crescimento estão diretamente relacionados a proliferação celular, contudo a relação destes com moléculas da matriz extracelular bem como as vias desencadeadas a partir desta interação ainda permanecem por serem elucidadas.

A avaliação da expressão de *EGFR* e *HER2* por meio da técnica de Hibridização In Situ revelou que áreas carcinomatosas *in situ* apresentam maior expressão do RNA mensageiro em relação às áreas invasoras. Estes resultados concordaram com os achados na avaliação das proteínas na imuno-histoquímica e sinalizam a participação destes receptores nos estágios iniciais de progressão neoplásica. Porém, quando avaliamos a expressão de *EGFR*, *HER-2* e de versican, não foi possível observarmos relação entre as moléculas. Aparentemente, o proteoglicano não interfere na transcrição dos receptores, no entanto são necessários estudos mais aprofundados para descartarmos possíveis relações entre a expressão de versican e RNAm.

Ao analisarmos por imuno-histoquímica a expressão dos receptores EGFR e HER-2, observamos uma perda da marcação membranar e aumento de expressão citoplasmática dessas moléculas, principalmente em células carcinomatosas invasoras. Diante disso, avaliamos a expressão não nuclear destes receptores utilizando a técnica de imunofluorescência. Estes resultados estão descritos em APÊNDICES do presente documento e serão formatados para futura publicação em forma de artigo científico.

Uma relação entre CD44 e versican também foi observada nas áreas invasoras dos carcinossarcomas. Este resultado reforça a participação do proteoglicano no processo de invasão tumoral, uma vez que o CD44 está diretamente envolvido no mecanismo de motilidade celular ao interagir com AH, segundo achados da literatura. Estas moléculas formam um complexo capaz de desencadear vias de sinalização que culminam em proliferação e motilidade celular.

No intuito de aprofundar nossos conhecimentos a respeito dos carcinossarcomas caninos, vinte casos diagnosticados como carcinossarcomas, utilizando os critérios adotados por Misdorp (2002) e Cassali et al. (2014), foram revisados pelo professor Dr. Fernando Schmitt de acordo com os parâmetros histopatológicos da classificação da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012) de tumores mamários humanos. Destes oito casos foram classificados como carcinomas de células fusiformes, seis carcinossarcomas, cinco carcinomas produtores de matriz e um carcinoma pouco diferenciado. Adicionalmente, realizamos a técnica imuno-histoquímica para avaliação da expressão de citoqueratina AE1/AE3, vimentina, p63 e versican em componentes epiteliais e fusiformes presentes nestes tumores. Também foi realizada a técnica de imunofluorescência para avaliarmos a

co-expressão de vimentina e citoqueratina em células epiteliais invasoras e técnica de Hibridização In Situ para detectar a presença de RNAm de versican. Estes resultados estão sendo compilados e fazem parte do terceiro trabalho, cujo objetivo é caracterizar morfológicamente e avaliar a expressão de citoqueratina AE1/AE3, vimentina, p63, ácido hialurônico e versican em células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais em carcinossarcomas da glândula mamária canina.

Diante dos resultados obtidos e inúmeras indagações aventadas ao longo do período de doutoramento, temos o intuito de aprofundar os estudos de interação matriz extracelular e células neoplásicas a partir de experimentos *in vitro* por meio do cultivo de células neoplásicas, identificando as vias de sinalização que são induzidas sob o estímulo do proteoglicano sulfatado versican e, desta forma, darmos sequência às pesquisas de progressão tumoral e estabelecermos uma linha de pesquisa voltada para o estudo da interação entre matriz extracelular e câncer.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, A.; PURNELL, P.; NGUYEN, L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. **Exp Mol Pathol**, v. 86, n. 2, p. 95-100, Apr 2009.

AGUIAR, F. N. et al. Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 35, n. 3, p. 97-102, Mar 2013.

ALBA, J. et al. HER2 status determination using RNA-ISH--a rapid and simple technique showing high correlation with FISH and IHC in 141 cases of breast cancer. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 8, p. 1021-7, Aug 2012.

ALLDINGER, S. et al. Characterization of a canine CD44 specific monoclonal antibody. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 46, n. 1, p. 19-32, Feb 1999.

ALVES, M. R. et al. Mutational status of VHL gene and its clinical importance in renal clear cell carcinoma. **Virchows Arch**, v. 465, n. 3, p. 321-30, Sep 2014.

APPERT-COLLIN, A. et al. Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. **Front Pharmacol**, v. 6, p. 283, 2015.

ASPBERG, A. et al. Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. **J Biol Chem**, v. 274, n. 29, p. 20444-9, Jul 16 1999.

AUCLAIR, P. L.; ELLIS, G. L. Atypical features in salivary gland mixed tumors: their relationship to malignant transformation. **Mod Pathol**, v. 9, n. 6, p. 652-7, Jun 1996.

AULER, P. et al. Myeloid metaplasia in canine mixed mammary tumors: occurrence and characterization. **Vet Q**, v. 31, n. 4, p. 173-7, Dec 2011.

BAI, Y. et al. Inhibition of the hyaluronan-CD44 interaction by merlin contributes to the tumor-suppressor activity of merlin. **Oncogene**, v. 26, n. 6, p. 836-50, Feb 8 2007.

BERTAGNOLLI, A. C. et al. Canine mammary mixed tumours: immunohistochemical expressions of EGFR and HER-2. **Aust Vet J**, v. 89, n. 8, p. 312-7, Aug 2011.

BHARGAVA, R. et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. **Mod Pathol**, v. 18, n. 8, p. 1027-33, Aug 2005.

BIECHE, I. et al. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. **Int J Cancer**, v. 106, n. 5, p. 758-65, Sep 20 2003.

BILL, A. et al. Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators. **Cell**, v. 143, n. 2, p. 201-11, Oct 15 2010.

- BODE-LESNIEWSKA, B. et al. Distribution of the Large Aggregating Proteoglycan Versican in Adult Human Tissues. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 303-312, 1996.
- BUESS, M. et al. Tumor-endothelial interaction links the CD44(+)/CD24(-) phenotype with poor prognosis in early-stage breast cancer. **Neoplasia**, v. 11, n. 10, p. 987-1002, Oct 2009.
- CANAVESE, G. et al. Expression of proteoglycan versican in in situ breast lesions: relations between stromal changes, histotype, and invasion. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 2, p. 97-103, Feb 15 2011.
- CASSALI, G.D. *et al.* Mammary gland diagnosis of the Laboratory of Comparative Pathology - UFMG, from 2000 to 2008. In: 34 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2009, São Paulo. **Clínica Veterinária (Supplement)**. São Paulo : Editora Guará, 2009. v. 14. p. 173-173.
- CASSALI, G. D. et al. Canine mammary mixed tumours: a review. **Vet Med Int**, v. 2012, p. 274608, 2012.
- CASSALI, G. D. et al. Cytological diagnosis of a metastatic canine mammary tumor in pleural effusion. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 307-310, 1999.
- CASSALI GD, L. G., FERREIRA E, ESTRELA-LIMA A, DE NARDI AB, GHEVER C, ET AL. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Braz J Vet Pathol**, v. 7, n. 2, p.38-69, 2014.
- CATTARUZZA, S.; NICOLOSI, P. A.; PERRIS, R. Proteoglycans in the control of tumor growth and metastasis formation. **Connect Tissue Res**, v. 49, n. 3, p. 225-9, 2008.
- CHIU, C. G. et al. HER-3 overexpression is prognostic of reduced breast cancer survival: a study of 4046 patients. **Ann Surg**, v. 251, n. 6, p. 1107-16, Jun 2010.
- CHOOCHEEP, K. et al. Versican facilitates chondrocyte differentiation and regulates joint morphogenesis. **J Biol Chem**, v. 285, n. 27, p. 21114-25, Jul 2 2010.
- DAMASCENO, K. A. et al. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumours: is there an association with clinical pathological factors, invasion and overall survival? **BMC Vet Res**, v. 8, p. 195, 2012.
- DAMASCENO, K.A. et al. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. **Vet J**, v. 200, p. 146-51, 2014.
- DAMASCENO, K. A. et al. Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland. **Histol Histopathol**, p. 11705, Dec 15 2015.
- DU, W. W. et al. Versican G3 promotes mouse mammary tumor cell growth, migration, and metastasis by influencing EGF receptor signaling. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13828, 2010.

DU, W. W. et al. Versican G3 domain modulates breast cancer cell apoptosis: a mechanism for breast cancer cell response to chemotherapy and EGFR therapy. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26396, 2011.

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

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

ERDÉLYI, I. **Extracellular matrix in canine mammary tumors with special focus on versican, a versatile extracellular proteoglycan**. 2006. 158f Tese Proefschrift Universiteit Utrecht, Budapeste

ERDELYI, I. et al. Immunohistochemical evaluation of versican, in relation to chondroitin sulphate, in canine mammary tumours. **Histol Histopathol**, v. 18, n. 4, p. 1067-80, Oct 2003.

ERDELYI, I. et al. Expression of versican in relation to chondrogenesis-related extracellular matrix components in canine mammary tumors. **Histochem Cell Biol**, v. 124, n. 2, p. 139-49, Aug 2005.

FERREIRA, E. et al. HER-2 gene expression in atypical ductal hyperplasia associated with canine mammary carcinomas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 609-612, 2014.

FOWLER, M. H. et al. Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. **Mod Pathol**, v. 19, n. 3, p. 350-5, Mar 2006.

FREY, H. et al. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. **FEBS J**, v. 280, n. 10, p. 2165-79, May 2013.

GAMA, A. et al. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. **Vet Pathol**, v. 40, n. 4, p. 412-20, Jul 2003.

GENELHU, M. C. et al. A comparative study between mixed-type tumours from human salivary and canine mammary glands. **BMC Cancer**, v. 7, p. 218, 2007.

GNEPP, D. R. Carcinoma ex-pleomorphic adenoma. In: BARNES, L. (Ed.). **WHO Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC: Press, 2005. p.242-243.

GOBBI, H. et al. Metaplastic breast tumors with a dominant fibromatosis-like phenotype have a high risk of local recurrence. **Cancer**, v. 85, n. 10, p. 2170-82, May 15 1999.

GORTER, A. et al. Versican expression is associated with tumor-infiltrating CD8-positive T cells and infiltration depth in cervical cancer. **Mod Pathol**, v. 23, n. 12, p. 1605-15, Dec 2010.

- GOTTE, M.; YIP, G. W. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. **Cancer Res**, v. 66, n. 21, p. 10233-7, Nov 1 2006.
- GRANDI, F. et al. Extramedullary hematopoiesis in a case of benign mixed mammary tumor in a female dog: cytological and histopathological assessment. **BMC Vet Res**, v. 6, p. 45, 2010.
- HAMPE, J. F.; MISDORP, W. Tumours and dysplasias of the mammary gland. **Bull World Health Organ**, v. 50, n. 1-2, p. 111-33, 1974.
- HELLMEN, E. Complex mammary tumours in the female dog: a review. **J Dairy Res**, v. 72 Spec No, p. 90-7, 2005.
- HENNESSY, B. T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer Res**, v. 69, n. 10, p. 4116-24, May 15 2009.
- HERNANDEZ, D. et al. Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 2, p. 269-75, Feb 2011.
- HINRICHS, U.; RUTTEMAN, G. R.; NEDERBRAGT, H. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. **Br J Cancer**, v. 80, n. 9, p. 1359-65, Jul 1999.
- HU, M. et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. **Cancer Cell**, v. 13, n. 5, p. 394-406, May 2008.
- HU, Y. H. et al. Aberrant protein expression and promoter methylation of p16 gene are correlated with malignant transformation of salivary pleomorphic adenoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 135, n. 7, p. 882-9, Jul 2011.
- INCE, T. A. et al. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. **Cancer Cell**, v. 12, n. 2, p. 160-70, Aug 2007.
- KARVINEN, S. et al. Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 1, p. 86-94, Jan 2003.
- KAWASHIMA, H. et al. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44. **J Biol Chem**, v. 275, n. 45, p. 35448-56, Nov 10 2000.
- KIM, S. et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 102-6, Jan 1 2009.
- KIM, J.H. et al. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study. **Vet J**, v. 189, p. 318-322, 2011.
- KISCHEL, P. et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. **Int J Cancer**, v. 126, n. 3, p. 640-50, Feb 1 2010.

KLINGBEIL, P. et al. CD44 variant isoforms promote metastasis formation by a tumor cell-matrix cross-talk that supports adhesion and apoptosis resistance. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 2, p. 168-79, Feb 2009.

KNAPP, D. W.; WATERS, D. J. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. **Molecular Medicine Today**, v. 1, p. 8-11, 1997.

KODAMA, J. et al. Prognostic significance of stromal versican expression in human endometrial cancer. **Ann Oncol**, v. 18, n. 2, p. 269-74, Feb 2007.

KRESSE, H.; SCHONHERR, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **J Cell Physiol**, v. 189, n. 3, p. 266-74, Dec 2001.

LATTA, E. K. et al. The role of HER2/neu overexpression/amplification in the progression of ductal carcinoma in situ to invasive carcinoma of the breast. **Mod Pathol**, v. 15, n. 12, p. 1318-25, Dec 2002.

LAVALLE, G. E. et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Vet Pathol**, v. 46, n. 6, p. 1275-80, Nov 2009.

LEE, D. Y. et al. A 3'-untranslated region (3'UTR) induces organ adhesion by regulating miR-199a* functions. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4527, 2009.

LEE, H.C. et al. Cancer metastasis and EGFR signaling is suppressed by amiodarone-induced versican V2. **Oncotarget**, v. 6, n. 40, p. 42976-87, 2015.

LEWIS, J. E.; OLSEN, K. D.; SEBO, T. J. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. **Hum Pathol**, v. 32, n. 6, p. 596-604, Jun 2001.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 375-9, May 17 2001.

LUINI, A. et al. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. **Breast Cancer Res Treat**, v. 101, n. 3, p. 349-53, Mar 2007.

MATSUMOTO, K. et al. Distinct interaction of versican/PG-M with hyaluronan and link protein. **J Biol Chem**, v. 278, n. 42, p. 41205-12, Oct 17 2003.

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

MISDORP, W. et al. Canine malignant mammary tumors. 3. Special types of carcinomas, malignant mixed tumors. **Vet Pathol**, v. 10, n. 3, p. 241-56, 1973.

MISDORP, W. Histological classification of the mammary tumors of the dog and the cat. In: SERIES, S. (Ed.). **WHO International Histological Classification Tumors of Domestic Animals**. Washington: DC: AFIP, 1999. p.59.

MISDORP W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4th. Iowa State: University of California, 2002. p.575-606.

- MOULTON, J. E. et al. Canine Mammary Tumors. **Path Vet**, v. 7, p. 289-320, 1970.
- MUKARATIRWA S.; NEDERBRAGT H. Tenascin and proteoglycans: the role of tenascin and proteoglycans in canine tumours. **Res Vet Sci**, v. 73, p. 1-8, 2002.
- NABA, A. et al. The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era. **Matrix Biol**, Jul 8 2015.
- NAOR, D.; SIONOV, R. V.; ISH-SHALOM, D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. **Adv Cancer Res**, v. 71, p. 241-319, 1997.
- NASO, M. F.; ZIMMERMANN, D. R.; IOZZO, R. V. Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional analysis of its promoter. **J Biol Chem**, v. 269, n. 52, p. 32999-3008, Dec 30 1994.
- NASTASE, M. V.; IOZZO, R. V.; SCHAEFER, L. Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology. **Biochim Biophys Acta**, v. 1840, n. 8, p. 2460-70, Aug 2014.
- NWABO KAMDJE, A. H. et al. Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment. **Cell Signal**, v. 26, n. 12, p. 2843-56, Dec 2014.
- OLAYIOYE, M. A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. **Breast Cancer Res**, v. 3, n. 6, p. 385-9, 2001.
- OWEN, L. N.; WHO. **Classification of tumours in domestic animals**. World Health Organization: Geneva: 3-53 p. 1980.
- OZTURK, M. et al. Detection of c-erbB-2 mRNAs using dig-labelled oligonucleotide probe with in situ hybridisation in human breast carcinoma: comparison with immunohistochemical results. **Anal Cell Pathol**, v. 16, n. 4, p. 201-9, 1998.
- PALTIAN, V. et al. Expression of CD44 in canine mammary tumours. **J Comp Pathol**, v. 141, n. 4, p. 237-47, Nov 2009.
- PIRINEN, R. et al. Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis. **Hum Pathol**, v. 36, n. 1, p. 44-50, Jan 2005.
- PUKKILA, M. J. et al. Versican expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **J Clin Pathol**, v. 57, n. 7, p. 735-9, Jul 2004.
- PUKKILA, M. et al. High stromal versican expression predicts unfavourable outcome in oral squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 3, p. 267-72, Mar 2007.
- REIS-FILHO, J. S. et al. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 6, p. R1028-35, 2005.
- REIS-FILHO, J. S. et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. **Histopathology**, v. 49, n. 1, p. 10-21, Jul 2006.

RICCIARDELLI, C. et al. Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 4, n. 4, p. 963-71, Apr 1998.

RICCIARDELLI, C. et al. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 4, p. 1054-60, Apr 2002.

RICCIARDELLI, C. et al. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. **J Biol Chem**, v. 282, n. 14, p. 10814-25, Apr 6 2007.

RICCIARDELLI, C. et al. The biological role and regulation of versican levels in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 233-45, Jun 2009.

RODRIGUES M.A., GAMBA C.O., FARIA J.A.Q.A., FERREIRA E., GOES A.M., GOMES D.A., CASSALI G.D. Inner nuclear membrane localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in spontaneous canine model of invasive micropapillary carcinoma of the mammary gland, **Pathol Res and Pract** (2015), In press. Nov 27 2015.

ROSKOSKI, R., JR. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. **Pharmacol Res**, v. 79, p. 34-74, Jan 2014a.

ROSKOSKI, R., JR. ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. **Pharmacol Res**, v. 87, p. 42-59, Sep 2014b.

RUTNAM, Z. J.; WIGHT, T. N.; YANG, B. B. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules. **Matrix Biol**, v. 32, n. 2, p. 74-85, Mar 11 2013.

SASSI, F. et al. Immunohistochemical characterization of mammary squamous cell carcinoma of the dog. **J Vet Diagn Invest**, v. 20, n. 6, p. 766-73, Nov 2008.

SCHAEFER, L. Proteoglycans, key regulators of cell-matrix dynamics. **Matrix Biol**, v. 35, p. 1-2, Apr 2014.

SCHWARTZ, T. L. et al. Metaplastic breast cancer: histologic characteristics, prognostic factors and systemic treatment strategies. **Exp Hematol Oncol**, v. 2, n. 1, p. 31, 2013.

SHENG, W. et al. The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 3, p. 1330-40, Mar 2005.

SHENG, W. et al. Versican mediates mesenchymal-epithelial transition. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 4, p. 2009-20, Apr 2006.

SHENG, W. et al. Versican modulates gap junction intercellular communication. **J Cell Physiol**, v. 211, p. 210-219, 2007.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese Hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciência Rural**, v. 34, p. 625-633, 2004.

- SKANDALIS, S. S. et al. Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. **BMC Cancer**, v. 11, p. 314, 2011.
- SORENMO, K. U.; WORLEY, D. R.; GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the Mammary Gland. In: WITHROW, S. J. e MACEWEN'S, E. G. (Ed.). **Small clinical veterinary oncology**. 5th. St Louis: Saunders Elsevier, 2013. p.538-556.
- SUWIWAT, S. et al. Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 7, p. 2491-8, Apr 1 2004.
- TAKAHASHI, Y. et al. Versican G1 and G3 domains are upregulated and latent transforming growth factor-beta binding protein-4 is downregulated in breast cancer stroma. **Breast Cancer**, v. 19, n. 1, p. 46-53, Jan 2012.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Insights into the key roles of proteoglycans in breast cancer biology and translational medicine. **Biochim Biophys Acta**, v. 1855, n. 2, p. 276-300, Apr 2015.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **FEBS J**, v. 277, n. 19, p. 3904-23, Oct 2010.
- TOKUDOME, N. et al. A case of carcinosarcoma of the breast. **Breast Cancer**, v. 12, n. 2, p. 149-53, 2005.
- TSE, G. M. et al. Metaplastic carcinoma of the breast: a clinicopathological review. **J Clin Pathol**, v. 59, n. 10, p. 1079-83, Oct 2006.
- UNGEFROREN, H. et al. Interaction of tumor cells with the microenvironment. **Cell Commun Signal**, v. 9, p. 18, 2011.
- UVA, P. et al. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. **BMC Genomics**, v. 10, p. 135, 2009.
- VAUGHT, D. B. et al. HER3 is required for HER2-induced preneoplastic changes to the breast epithelium and tumor formation. **Cancer Res**, v. 72, n. 10, p. 2672-82, May 15 2012.
- VIALE, G. et al. Discordant assessment of tumor biomarkers by histopathological and molecular assays in the EORTC randomized controlled 10041/BIG 03-04 MINDACT trial breast cancer : Intratumoral heterogeneity and DCIS or normal tissue components are unlikely to be the cause of discordance. **Breast Cancer Res Treat**. v. 155, n. 3, p. 463-9, 2016.
- VOZ, M. L.; VAN DE VEN, W. J.; KAS, K. First insights into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Adv Dent Res**, v. 14, p. 81-3, Dec 2000.

- WANG, W. et al. Ligation of TLR2 by versican: a link between inflammation and metastasis. **Arch Med Res**, v. 40, n. 4, p. 321-3, May 2009.
- WARGOTZ, E. S.; NORRIS, H. J. Metaplastic carcinomas of the breast. I. Matrix-producing carcinoma. **Hum Pathol**, v. 20, n. 7, p. 628-35, Jul 1989a.
- WARGOTZ, E. S.; DEOS, P. H.; NORRIS, H. J. Metaplastic carcinomas of the breast. II. Spindle cell carcinoma. **Hum Pathol**, v. 20, n. 8, p. 732-40, Aug 1989b.
- WARGOTZ, E. S.; NORRIS, H. J. Metaplastic carcinomas of the breast. III. Carcinosarcoma. **Cancer**, v. 64, n. 7, p. 1490-9, Oct 1 1989c.
- WARGOTZ, E. S.; NORRIS, H. J. Metaplastic carcinomas of the breast. IV. Squamous cell carcinoma of ductal origin. **Cancer**, v. 65, n. 2, p. 272-6, Jan 15 1990a.
- WARGOTZ, E. S.; NORRIS, H. J. Metaplastic carcinomas of the breast: V. Metaplastic carcinoma with osteoclastic giant cells. **Hum Pathol**, v. 21, n. 11, p. 1142-50, Nov 1990b.
- WEEN, M. P.; OEHLER, M. K.; RICCIARDELLI, C. Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 2, p. 1009-29, 2011.
- WEIDLE, U. H. et al. Differential splicing generates new transmembrane receptor and extracellular matrix-related targets for antibody-based therapy of cancer. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 8, n. 5, p. 211-26, Sep-Oct 2011.
- WEIGELT, B. et al. Metaplastic breast carcinoma: more than a special type. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 3, p. 147-8, Mar 2014.
- WIGHT, T. N. Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 5, p. 617-23, Oct 2002.
- WITTON, C. J. et al. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. **J Pathol**, v. 200, n. 3, p. 290-7, Jul 2003.
- WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, Nov 1 2013.
- WU, Y. et al. Overexpression of the C-terminal PG-M/versican domain impairs growth of tumor cells by intervening in the interaction between epidermal growth factor receptor and beta1-integrin. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 11, p. 2227-37, May 1 2004.
- WU, Y. J. et al. The interaction of versican with its binding partners. **Cell Res**, v. 15, n. 7, p. 483-94, Jul 2005.
- YANG, X. Q. et al. Quantum dot-based quantitative immunofluorescence detection and spectrum analysis of epidermal growth factor receptor in breast cancer tissue arrays. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2265-73, 2011.

YEE, A. J. et al. The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. **Breast Cancer Res**, v. 9, n. 4, p. R47, 2007.

YOON, H. et al. Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15632-7, Nov 26 2002.

ZHAN, L.; XIANG, B.; MUTHUSWAMY, S. K. Controlled activation of ErbB1/ErbB2 heterodimers promote invasion of three-dimensional organized epithelia in an ErbB1-dependent manner: implications for progression of ErbB2-overexpressing tumors. **Cancer Res**, v. 66, n. 10, p. 5201-8, May 15 2006.

ZHANG, Y. et al. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. **J Biol Chem**, v. 273, n. 33, p. 21342-51, Aug 14 1998.

ZHENG, P. S. et al. Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. **FASEB J**, v. 18, n. 6, p. 754-6, Apr 2004.

ZIMMERMANN, D. R.; RUOSLAHTI, E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. **EMBO J**, v. 8, n. 10, p. 2975-81, Oct 1989.

10. ANEXOS

Anexo 1 - Estadiamento clínico (TNM) dos carcinomas mamários da cadela

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

Agrupamento por estádios

Estadiamento da OMS modificado para tumores mamários da cadela

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

T- Tamanho do tumor primário; N – Linfonodo; M – Metástase

(FONTE: CAVALCANTI e CASSALI, 2006, modificado de OWEN, 1980).

Anexo 2 - Critérios utilizados na graduação de tumores mamários de cadela conforme o grau de malignidade.

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

Alocação do grau tumoral

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

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

Anexo 3- Certificado CEUA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 53, relativo ao projeto intitulado "EXPRESSÃO DE VERSICAN E INTERAÇÃO COM RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR NOS TUMORES PRODUTORES DE MATRIZ DA GLÂNDULA MAMÁRIA CANINA ", que tem como responsável Geovanni Dantas Cassali, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de

Notice (8): Undefined variable: data_aprovacao

[APP/views/elements/email/html/decisao_certificado_aprovacao.ctp, line 5]

. Este certificado espira-se em 15/03/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 53, related to the Project entitled "Versican expression and cell surface receptors interaction in matrix- producing tumors in canine mammary gland", under the supervision of Geovanni Dantas Cassali, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in

Notice (8): Undefined variable: data_aprovacao

[APP/views/elements/email/html/decisao_certificado_aprovacao.ctp, line 11]

. This certificates expires in 15/03/2017.

Notice (8): Undefined variable: nome_cordenador

[APP/views/elements/email/html/decisao_certificado_aprovacao.ctp, line 15]

Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 15/03/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

11. APÊNDICES

APÊNDICE A- Resultados parciais

CYTOPLASMIC EGFR AND HER-2 EXPRESSION IN IN MALIGNANT MATRIX-PRODUCING TUMOURS IN THE CANINE MAMMARY GLAND

Objective

The aim of this study was to evaluate the cytoplasmic EGFR and HER-2 expression by immunohistochemistry and confocal technique and their relationship with clinical pathological factors in canine carcinomas in mixed tumors and carcinosarcomas of the mammary gland.

Material and methods

Immunohistochemical evaluation

EGFR and HER-2 expression was assessed in epithelial cells using the scores defined according to the consensus of the American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists (ASCO/CAP; Wolff et al., 2013) and adapted from Bertagnolli et al. (2011) as follows: (-), no staining; (1+), weak incomplete membrane staining in more than 10% of tumour cells; (2+), incomplete and/or weak-to-moderate membrane staining in more than 10% of tumour cells or complete and strong staining in less than 10% of tumour cells; and (3+), complete and strong staining in at least 10% tumour cells. Cytoplasmic expression of EGFR and HER-2 was evaluated in *in situ* and invasive carcinomatous cells qualitatively as follows: absent (0), weak (1), moderate (2) and strong (3).

Confocal microscopy

In order to measure the non-nuclear EGFR and HER-2 expression, labelling immunofluorescence was performed in thirteen cases of CMTs and CSs that were immunohistochemically classified in low and high versican expression groups.

Immunofluorescence was performed as previously described with minor modifications (RODRIGUES et al., 2015). In Brief, FFPE tissue sections were dewaxed, rehydrated and unmasked in trilogy solution (Cell Marque, Koclin, CA, USA) in pressurized heating (125°C) during 20 minutes according to manufacturer's instructions. Next, samples were rinsed in Phosphate Buffered Saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl and 10 mM phosphate buffer solution, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, USA),

and then incubated in PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for another 20 minutes and blocked in PBS containing 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 30 minutes. The sections were incubated with a mouse monoclonal antibody against EGFR which interacts with the extracellular domain of this receptor (1:100, clone 31G7, Carlsbad, Zymed - Life Technologies, Carlsbad, California, USA) or with a rabbit monoclonal antibody *HER-2 (policlonal, Dako, 1:100)* overnight at 4°C, then rinsed 3 times for 5 minutes in PBS. Subsequently, sections were incubated with Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG antibody (1:1000, Life Technologies) or Alexa Fluor® 555 Goat anti-mouse IgG antibody (1:1000, Life Technologies), *cytokeratina (AE1/AE3/Alexa Fluor 488, Affimetrix, 1:250)* and Hoechst 33258 (1 µg/mL, Life Technologies) for 1 hour at room temperature. Next, samples were washed 3x in PBS for 10 minutes and then mounted in Prolong Gold Antifade reagent (Life Technologies). The negative control was included in all reactions by omitting primary antibodies. Images were collected using a Zeiss LSM 5 Live or 880 (Carl Zeiss, Jena, Germany) confocal microscopes using an oil 40x 1.3 NA or an oil 63x 1.4 NA objective lens. Samples were excited at: 405 nm and observed at 415-480 nm to detect Hoechst, 488 nm and observed at 500-525 nm to detect Alexa Fluor 488. 532 (LSM 5 Live) or 543 (LSM 880) nm and observed using a 560 Long pass filter for LSM 5 Live and similar configuration using GaAsP detector for LSM 880 to detect Alexa Fluor 555 signal. The software Zeiss Efficient Navigation (ZEN) was used for orthogonal projections (XY, XZ, YZ). The fluorescence microscopy results were evaluated in 5 *in situ* and 5 invasive areas of CMTs and CSs. Densitometric analysis was performed to using software ImageJ.

Results

Female dogs had a mean age of 10,6 years (ranging from 5 to 14 years). The mean tumour diameter was 4 cm (0.5 - 9 cm). Regional metastasis was observed in 2/13 (16.7%) of the dogs. A histological grade I, II and III was observed in 6/13 (46.2%), 4/13 (30.8%) and 3/13 (23.1%) of the samples, respectively. The clinicopathological are presented in Table 1.

We performed confocal microscopy to observe the non nuclear localization of the EGFR and HER-2 in *in situ* and invasive areas of histological types. Then, we performed double-labeling with cytoqueratin AE1/AE3 to identify carcinomatous cells. Three-dimensional reconstruction of serial confocal immunofluorescence images confirmed that EGFR and HER-2 localize in cytoplasm cell.

We results showed that *in situ* carcinomatous areas, regardless of histological type, presented a higher HER-2 expression than invasive areas ($p = 0.0243$). Significant differences for this marker were also observed between *in situ* and invasive carcinomatous areas only of CSs ($p = 0.0248$) and between invasive areas in CMTs and CSs (0.0289). EGFR expression did not differ between *in situ* and invasive carcinomatous areas in histological types.

Table 1. Clinicopathological features of tumours in canine mammary gland

Parameters	n/total (%)
Mean age	10.6 years
Size	4 cm
Lymph node Metastasis	
Negative	10/12 (83.3%)
Positive	2/12 (16.7%)
Pulmonary metastases	
Negative	10/13 (76.9%)
Positive	3/13 (23.1%)
Clinical staging	
I	2/13 (16.7%)
II	5/13 (41.7%)
III	1/13 (8.3%)
IV	1/13 (8.3%)
V	3/13 (25%)
Histological grade	
I	6/13 (46.2%)
II	4/13 (30.8%)
III	3/13 (23.1%)

Table 2. EGFR and HER-2 expression in tumours in canine mammary gland

Immunofluorescence*		<i>In situ</i>	Invasor
EGFR		82,38	81,79
HER-2		94,40	82,54
Immunohistochemistry			
Cytoplasmic EGFR	<i>absent</i>	1/13 (8.3%)	0/13 (0%)
	<i>weak</i>	0/13 (0%)	1/13 (7.7%)
	<i>moderate</i>	7/13 (58.3%)	7/13 (53.8%)
	<i>strong</i>	4/13 (33.3%)	5/13 (38.5%)
Cytoplasmic HER-2	<i>absent</i>	1/13 (7.7%)	0/13 (0%)
	<i>weak</i>	2/13 (15.4%)	2/13 (15.4%)
	<i>moderate</i>	6/13 (46.2%)	7/13 (53.8%)
	<i>strong</i>	4/13 (30.8%)	4/13 (30.8%)
Membrane EGFR	0	0/13 (0%)	0/13 (0%)
	1	1/13 (8.3%)	2/13 (15.4%)
	2	1/13 (8.3%)	8/13 (61.5%)
	3	10/13 (83.3%)	3/13 (23.1%)
Membrane HER-2	0	0/13 (0%)	1/13 (7.7%)
	1	2/13 (18.2%)	6/13 (46.2%)
	2	7/13 (63.6%)	6/13 (46.2%)
	3	2/13 (18.2%)	0/13 (0%)

*Densitometric analysis mean

APÊNDICE B- Atividades desenvolvidas no período do doutorado

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

1. Professora Voluntária de Patologia Geral na UFMG: 2012-2013.
2. Participação no projeto de Extensão Universitária “Diagnóstico cito e histopatológico de biópsias caninas e felina” realizado no Instituto de Ciências Biológicas, sob coordenação do professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, 2009-2015.
3. Pesquisadora em Saúde Pública FIOCRUZ/IGM-BA, 2015-atual.

TRABALHOS RELACIONADOS À TESE

Artigos publicados em periódico

DAMASCENO KA, FERREIRA E, ESTRELA-LIMA A, GAMBA CDO, MIRANDA FF, ALVES MR, et al. HER-2 and EGFR mRNA Expression and Its Relationship with Versican in Malignant Matrix-Producing Tumors of the Canine Mammary Gland. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1-14, 2016. *Este trabalho foi contemplado com o prêmio Ana Margarida no IV Encontro de Patologia da UFMG.*

DAMASCENO, K. A.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; BOSCO Y.; SILVA L.P.; BARROS, A.L.B.; BERTAGNOLLI, A.C.; CASSALI, G.D. Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland. **Histol Histopathol**, p. 11705, 2016.

Resumos publicados em anais de eventos

DAMASCENO, K.A.; BOSCO, Y.O.; SOARES, L.S.O.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Expressão de EGFR e HER-2 em carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas da glândula mamária canina. In: IV Encontro de Patologia da UFMG, 2014, Belo Horizonte. Anais do IV Encontro de Patologia da

UFMG, 2014, p.14-15.

DAMASCENO, K.A.; BOSCO, Y.O.; SOARES, L.S.O.; CASSALI, G.D. Matrix-producing tumors in canine mammary gland- a study of occurrence. In: III LUSO-BRAZILIAN CONGRESS OF THE EXPERIMENTAL PATHOLOGY, 2013, Tiradentes. Anais do III Luso-Brazilian Congress of the Experimental Pathology, São João Del Rei/MG, Experimental Pathology and Health Sciences, 2013, p.100. *Menção Honrosa no III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental.*

DAMASCENO, K.A.; ESTRELA-LIMA, A.; MONTEIRO, L.M.; CASSALI, G.D. Reação mioepitelial perivascular em carcinossarcomas na glândula mamária canina: relato de casos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA/ XVI ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA (ENAPAVE) 2013, Curitiba/PR. Archives of Veterinary Science, 2013, v. 18, (supl.2), p. 710.

DAMASCENO, K.A.; RABELO, B.S.; ESTRELA-LIMA, A.; FERREIRA, E.; ROCHA, R.M., BERTAGNOLLI, A.C., CASSALI, G.D. Expressão de versican e interação com receptores de superfície celular CD44 e fator de crescimento epidermal nos tumores produtores de matriz da glândula mamária canina. In: III Encontro de Patologia, 2012, Belo Horizonte/MG. Anais do III Encontro de Patologia, 2012.

Resumos enviados para apresentação em eventos

DAMASCENO K.A., FERREIRA E., ESTRELA-LIMA A., BOSCO Y., SILVA L.P., CASSALI G.D. Relationship between the expression of versican and EGFR, HER-2, HER-3 and CD44 in matrix-producing tumours in the canine mammary gland. 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 2015, Belo Horizonte. *Este trabalho foi premiado primeiro lugar na categoria Experimentação Animal.*

MIRANDA, F.F.; CASSALI G.D.; FERREIRA, E.; SILVA, L.P.; ESTRELA-LIM, A.; SOARES, L. S.O.; BOSCO, Y.O.; **DAMASCENO, K.A.** Expressão de EGFR de HER-2 em carcinomas em tumores mistos e carcinossarcomas da glândula mamária canina. In: XXIII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA / PRPQ, 2014, Belo Horizonte. XXIII SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2014.

TRABALHOS NÃO RELACIONADOS À TESE

5.1 Resumos publicados em anais de eventos

CAMPOS, C.B.; DAMASCENO, K.A.; GAMBA, C.O.; MONTEIRO, L.N.; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Carcinoma cribriforme em estadiamento avançado na glândula mamária canina relato de caso. In: 3º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária/ENAPAVE, 2015, Belo Horizonte. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária/ENAPAVE, 2015.

CAMPOS, C.B.; GAMBA, C.O.; **DAMASCENO, K.A.**; LAVALLE, G.E.; CASSALI, G.D. Special type of feline mammary gland tumors: glycogen-rich clear cell carcinoma. In: Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, 2014, Botucatu/SP. Anais do Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, 2014.

CASSALI, G.D.; MONTEIRO, L.N.; GAMBA, C.O.; **DAMASCENO, D.A.**; CAMPOS, C.B.; SALGADO, B. S. Cytological aspects of mammary papilla discharge of canine micropapillary carcinoma: case report. In: I Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, 2014, Botucatu/SP. Anais do I Simpósio Internacional de Oncologia Veterinária, 2014.

DAMASCENO, K. A.; BERTAGNOLLI, A.C.; ESTRELA-LIMA, A.; RIBEIRO, L.G.R.; RABELO, B.S.; CAMPOS, C.B.; BARROS, A.L.B.; CASSALI, G.D. Canine carcinomas in benign mixed tumours: versican expression and association with invasion. In: São Paulo Advanced School of Comparative Oncology, 2012, Águas de São Pedro/SP. BMC Proceedings. 2013, p.39. *Trabalho selecionado para apresentação, na categoria sponsored, no São Paulo Advanced School of Comparative Oncology, realizado nos dias 30 de setembro a 7 de outubro em Aguas de São Pedro (SP).*

CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; FERREIRA, E.; NUNES, F.C.; GAMBA, C.O.; **DAMASCENO, K.A.**; CAMPOS, C.B.; HORTA, R.S.; ARAÚJO, M.R.; MONTEIRO, L.M. Analysis of clinico-pathological data, therapeutical conduct and overall survival of canine mammary lesions attended at the Veterinary Hospital of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). In: II ENCONTRO DE PATOLOGIA MAMÁRIA: DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS

MAMÁRIAS DA CADELA, 2013, Belo Horizonte. Abstracts - II ENCONTRO DE PATOLOGIA MAMÁRIA DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DA CADELA, 2013, v. 7. p. 122-126.

RIBEIRO, A.M.; **DAMASCENO, K.A.**; FERREIRA, E.; LEITÃO, T.J.; SOARES, J. M.A.; RIBEIRO, R.I.M.A.; CASSALI, G.D. Relationship of ki-67 index and p63 expression in pleomorphic adenoma of the salivary gland. In: III LUSO-BRAZILIAN CONGRESS OF THE EXPERIMENTAL PATHOLOGY XIII International Symposium on Experimental Techniques, 2013, Tiradentes. Anais do III LUSO-BRAZILIAN CONGRESS OF THE EXPERIMENTAL PATHOLOGY, São João Del Rei/MG, Experimental Pathology and Health Sciences, 2013, v. 7, p.77.

CAMPOS, L.C.; CAMPOS, C.B.; **DAMASCENO, K.A.**; SOUZA, C.M.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Adenoma iridociliar em cão - relato de caso. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA/ XVI ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA (ENAPAVE) 2013, Curitiba/PR. Archives of Veterinary Science, 2013, v. 18, (supl.2), p. 523.

FARIAS, S.S.; RIBEIRO, L.G.R.; ESTRELA LIMA, A.; D'ASSIS, M.J.M.H.; SILVA, L.P.; **DAMASCENO, K.A.** Carcinoma de células escamosas primário de mama em cadela: relato de caso. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA/ XVI ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA (ENAPAVE) 2013, Curitiba/PR. Archives of Veterinary Science, 2013, v. 18, (supl.2), p. 571.

ARAÚJO, M.R.; **DAMASCENO, K.A.**; GAMBA, C.O.; REIS, D.C.; FERREIRA, E.; CASSALI, G.D. Tumor filodes da glândula mamária canina: Relato de cinco casos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA/ XVI ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA (ENAPAVE) 2013, Curitiba/PR. Archives of Veterinary Science, 2013, v. 18, (supl.2), p. 734.

RIBEIRO, A. M., **DAMASCENO, K. A.**, SOARES, J. M., RIBEIRO, R. I. M. A., FERREIRA, ENIO, CASSALI, G. D. Avaliação de imunomarcadores epitelial, mioepitelial e mesenquimal em tumores mistos de glândula salivar humana. In: XV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA e 15º ENCONTRO DE EX-RESIDENTES DO CEOMG, 2013, Belo Horizonte/MG. Anais do XV SIMPÓSIO MINEIRO DE

ONCOLOGIA e 15º ENCONTRO DE EX-RESIDENTES DO CEOMG, 2013.

DIAS, A.P.M., DIAS, E.J., GARCIA, N.F., GAMBA, C.O., **DAMASCENO, K.A.**, CASSALI, G. D. Análise Comparativa da Sobrevida Global e Avaliação Clínico-patológica de Carcinomas Micropapilares Invasivos e Carcinomas Ductais da Glândula Mamária Canina In: XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012, Belo Horizonte/MG. Anais do XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012.

RABELO, B.S.; SILVA, J.O.; **DAMASCENO, K.A.**; GAMBA, C.O.; FERREIRA, E.; CASSALI, G. D. Análise imunofenotípica para o Diagnóstico Diferencial de Carcinomas Sólidos na Glândula Mamária Canina: Modelo de Estudo comparativo para Mioepiteliomas Humanos? In: XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012, Belo Horizonte/MG. Anais do XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012.

DIAS, A.P.M., DIAS, E.J., GARCIA, N.F., GAMBA, C.O., **DAMASCENO, K.A.**, CASSALI, G. D. Análise Comparativa da Sobrevida Global e Avaliação Clínico-patológica de Carcinomas Micropapilares Invasivos e Carcinomas Ductais da Glândula Mamária Canina In: XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012, Belo Horizonte/MG. Anais do XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012.

SILVA, J.O.; RABELO, B. S.; BOSCO, Y.O.; GAMBA, C.O.; **DAMASCENO, K.A.**; CASSALI, G.D. Uma proposta de modelo comparativo de mioepiteliomas humanos. In: XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012, Belo Horizonte/MG. Anais do XIV SIMPÓSIO MINEIRO DE ONCOLOGIA, 2012.

DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A. C., ESTRELA-LIMA, ALESSANDRA, RIBEIRO, LORENA GABRIELA ROCHA, RABELO, B. S., CAMPOS, C. B., BARROS, A. L. B., CASSALI, G. D. Carcinomas em tumores mistos mamários caninos: expressão de versican e sua relação com invasão do estroma e com grau de diferenciação mioepitelial. In: III ENCONTRO DE PATOLOGIA, 2012, Belo Horizonte. Anais do III ENCONTRO DE PATOLOGIA, 2012.

DAMASCENO, K. A., RABELO, B. S., ESTRELA-LIMA, ALESSANDRA, FERREIRA, E., ROCHA, R. M., BERTAGNOLLI, A. C., CASSALI, G. D. Expressão de versican e interação com receptores de superfície celular CD44 e fator de crescimento epidermal nos tumores produtores de matriz da glândula mamária canina. In: III

ENCONTRO DE PATOLOGIA, 2012, Belo Horizonte. Anais do III ENCONTRO DE PATOLOGIA, 2012.

CAMPOS, C. B.; **DAMASCENO, K. A.**; GAMBA, C. O.; RIBEIRO, A. M.; LAVALLE, G. E.; CASSALI, G. D. Avaliação de fatores prognósticos e tratamento quimioterápico adjuvante em tumores mamários felinos. In: III ENCONTRO DE PATOLOGIA, 2012, Belo Horizonte. Anais do III ENCONTRO DE PATOLOGIA, 2012.

DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A. C., ESTRELA-LIMA, A. S., RIBEIRO, L. G. R., RABELO, B. S., CAMPOS, C. B., CASSALI, G. D. Versican expression in canine carcinomas in benign mixed tumors: study of pathological clinical factors, invasion and overall survival. In: VII ONCOVET, 2012, João Pessoa/PB. Anais do VII ONCOVET, 2012. *Segundo melhor trabalho no VII ONCOVET.*

DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A. C., ESTRELA-LIMA, A. S., CAMPOS, L.C., RIBEIRO, L. G. R., SOUZA, C. M., CASSALI, G. D. Carcinomas em tumores mistos benignos mamários caninos: Expressão de versican nos vários estágios de diferenciação das células mioepiteliais. In: VII ONCOVET, 2012, João Pessoa/PB. Anais do VII ONCOVET, 2012.

Artigos completos não relacionados à tese

RIBEIRO, LORENA G.R. ; ESTRELA-LIMA, A. ; COSTA NETO, J. M. ; ORIA, A. P. ; MOREIRA, E. L. T. ; DAMASCENO, KARINE A. ; D'ASSIS, M. J. M. H. ; COSTA, A. T. ; CASSALI, G. D. . Clinical, pathological and prognostic data from 37 female dogs with inflammatory mammary carcinoma.. Online Journal of Veterinary Research, v. 19, p. 1-14, 2015.

CAMPOS, C. B. ; GAMBA, C.O. ; **DAMASCENO, K. A.** ; LAVALLE, G. E. ; CASSALI, G. D. . Malignant adenomyo-epithelioma in a feline mammary gland. Online Journal of Veterinary Research, v. 19, p. 155-161, 2015.

GEOVANNI DANTAS CASSALI ; MONTEIRO, LIDIANNE NARDUCCI ; GAMBA, CONRADO DE OLIVEIRA ; **DAMASCENO, K. A.** ; DE CAMPOS, CECÍLIA

BONOLO ; SALGADO, BRENO SOUZA . Cytologic analysis of the mammary papillar discharge in a canine micropapillary carcinoma. *Veterinary Clinical Pathology JCR*, v. 44, p. n/a-n/a, 2015.

RESENDE, TALITA P.; PEREIRA, CARLOS E. R. ; VANNUCCI, FABIO A. ; ARAUJO, FERNANDO S. ; DOS SANTOS, JOSÉ LÚCIO ; CASSALI, GEOVANNI D. ; **DAMASCENO, KARINE A.** ; GUEDES, ROBERTO M. C. . Malignant peripheral nerve sheath tumour in a sow. *Acta Veterinaria Scandinavica (Online) JCR*, v. 57, p. 56, 2015.

CAMPOS, C. B., NUNES, F. C., GAMBA, C.O., **DAMASCENO, K. A.**, SOUZA, C. M., CAMPOS, L.C., G.D. CASSALI. Canine low-grade intra-orbital myxosarcoma: case report. *Veterinary Ophthalmology (Print)*. , p.n/a - n/a, 2014.

CASSALI, G.D., LAVALLE, G.E., FERREIRA, E., ESTRELA-LIMA, A., NARDI, A.B., FERNANDES, C.G., SOBRAL, R.A., AMORIM, R.L., OLIVEIRA, L.O., SUEIRO, F.A.R., BESERRA, H.E.O., BERTAGNOLLI, A.C., GAMBA, C.O., **DAMASCENO, K.A.**, CAMPOS, C.B., ARAUJO, M.R., CAMPOS, L.C., MONTEIRO, L.N., NUNES, F.C., HORTA, R.S., REIS, D.C., LUVIZZOTO, M.C.R., MAGALHÃES, G.M., RAPOSO, J.B., FERREIRA, A.M.R., TANAKA, N.M., GRANDI, F., UBUKATA, R., BATSCHINSKI, K., TERRA, E.M., SALVADOR, R.C.L., JARK, P.C., DELECRODI, J.E.R., NASCIMENTO, N.A., SILVA, D.N., SILVA, L.P., FERREIRA, K.C.R.S., FREHSE, M.S., SANTIS, G.W., SILVA, E.O., GUIM, T.N., KERR, B., CINTRA, P.P., SILVA, F.B.F., LEITE, J.S., MELLO, M.F.V., FERREIRA, M.L.G., FUKUMASU, H., SALGADO, B.S., TORRES, R. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.7, p.38 - 69, 2014.

ARAUJO, M.R., **DAMASCENO, K.A.**, GAMBA, C.O., CAMPOS, C.B., CAMPOS, L. C., REIS, D.C., SOUZA, C.M., CASSALI, G.D. Morphological and immuno-histochemical characterization of five phyllodes mammary gland tumors in dogs. *Online Journal of Veterinary Research*, v.18, p.688 - 695, 2014.

GAMBA, C.O., **DAMASCENO, K. A.**, ROCHA JUNIOR, S.S., MENDES, H.M.F., FALEIROS, R.R., CASSALI, G.D. Ovarian teratoma in an equine fetus: a case report. *The Veterinary Quarterly*, v.34, p.1 - 3, 2014.

MATOS, N.A., SILVA, J.F., **DAMASCENO, K.A.**, CASSALI, G.D., LEMOS, V.S., DUARTE, I.D. G., KLEIN, A. Proteinase-activated receptor 2 blockade impairs CCL11- or allergen-induced eosinophil recruitment in experimental pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 627 - 633, 2014.

DAMASCENO, K.A., BERTAGNOLLI, A.C., Estrela-Lima, A., RABELO, B.S., CAMPOS, L.C., RIBEIRO, L.G.R., CASSALI, G.D. Versican expression in myoepithelial cells from carcinomas in canine mixed mammary tumors. *The Veterinary Journal (London, England. 1997)*, v. 200, p. 146 - 151, 2014. *Este trabalho foi contemplado com o prêmio Ana Margarida no IV Encontro de Patologia da UFMG.*

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.

CAMPOS, L.C., SILVA, J.O., SOUZA, C.M., CAMPOS, C.B., GAMBA, C.O., **DAMASCENO, K.A.**, HORTA, R.S., LAVALLE, G.E., CASSALI, G.D. Adenocarcinoma papilar de seio nasal em cão: Abordagem histomorfológica, imunofenotípica e terapêutica. *Acta Scientiae Veterinariae (Online)*, v. 41, p. 1-6, 2013.

MATOS, N.A., SILVA, J.F., MATSUI, T.C., **DAMASCENO, K.A.**, DUARTE, I.D.G., LEMOS, V. S., CASSALI, G.D., KLEIN, A. Mast Cell Tryptase Induces Eosinophil Recruitment in the Pleural Cavity of Mice via Proteinase-Activated Receptor 2. *Inflammation*, v. 36, p. 1-13, 2013.

CASSALI, G.D, BERTAGNOLLI, A.C., FERREIRA, E., **DAMASCENO, K.A.**, GAMBA, C.O., CAMPOS, C.B. Canine Mammary Mixed Tumours: A Review. *Veterinary Medicine International*, v. 2012, p. 1 - 7, 2012.

TORÍBIO, J.M.M.L., ESTRELA-LIMA, A., MARTINS FILHO, E.F., RIBEIRO, L.G.R., D'ASSIS, M.J.M.H., TEXEIRA, R.G., **DAMASCENO, K. A.**, CASSALI, G.D., COSTA NETO, J.M. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, BA. *Revista Ceres (Online)*, v. 59, p. 427 - 432, 2012.

GAMBA, C.O., SILVA, J.O., CAMPOS, L.C., BERNARDES, V.F., **DAMASCENO, K.A.**, SOUZA, C. M., CAMPOS, C.B., CASSALI, G.D. Differential Diagnosis of Canine

Gastrointestinal Stromal Tumor. *Acta Scientiae Veterinariae (Online)*, v.40, p. 1-4, 2012.

DAMASCENO, K.A., RABELO, B.S., GAMBA, C.O., SOUZA, C.M., CAMPOS, L.C., CAMPOS, C.B., FERREIRA, E., CASSALI, G. D. Histopathological and immunophenotypical analysis of canine mucinous rectal adenocarcinoma. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 5, p. 74 - 77, 2012.

COSTA NETO, J.M., ESTRELA-LIMA, A.S., RIBEIRO, L.G.R., **DAMASCENO, K.A.**, TEIXEIRA, D.M., CRUZ, D.L., MELO, S.M.B., MOREIRA, E.L.T. Linfoma primário renal em cão: relato de caso. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 6, p. 11 - 17, 2012.

GAMBA, C. O., **DAMASCENO, K. A.**, FERREIRA, E., MALTA M. C.;, CASSALI, G. D. Tubulopapillary carcinoma of the mammary gland in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*): histopathological and immunophenotypical analysis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)*, v. 63, p. 1377 - 1381, 2012.

DAMASCENO, K. A., BERTAGNOLLI, A.C., ESTRELA-LIMA, a., RIBEIRO, L.G.R., RABELO, B.S., CAMPOS, C. B., BARROS, A.L.B., CASSALI, G.D. 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, p.1 - 10, 2012.

Aceito para publicação não relacionados à tese

DE CAMPOS, C. B.; **DAMASCENO, K. A.** ; GAMBA, C. O. ; RIBEIRO, A. M. ; MACHADO, C. J. ; LAVALLE, G. E. ; CASSALI, G. D. . Evaluation of prognostic factors and survival rates in malignant feline mammary gland neoplasms. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 2015.