

FABRIZIO GRANDI

**Fibroblastos associados ao câncer e correlação com
parâmetros patológicos em melanomas cutâneos
caninos**

Orientadora: Prof. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu – SP

2012

FABRIZIO GRANDI

**Fibroblastos associados ao câncer e correlação com
parâmetros patológicos em melanomas cutâneos
caninos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de concentração:
Oncopatologia

Orientadora: Prof. Dra. Noeme Sousa Rocha

Botucatu – SP

2012

Dedico esta singela obra a minha mãe Ana Maria Pechi Grandi, ao meu pai Mario Renzo Grandi (*in memoriam*) e ao meu irmão Giuliano Grandi. Em especial, à minha mãe por inúmeras vezes privar-se de suas atribuições mais elementares em nome da constante edificação de ambos os filhos enquanto homens de bem e de princípios.

DEDICATÓRIA

RESUMO

O melanoma é uma das neoplasias cutâneas mais comumente diagnosticadas no homem e nos cães. O microambiente tumoral é composto pelas células neoplásicas e células estromais interagindo constantemente para garantir a progressão tumoral. Os fibroblastos associados ao câncer (FAC) representam uma população heterogênea de células caracterizadas pela expressão de diversos marcadores incluindo a proteína α -SMA e S100A4. Acredita-se que estas células originem-se de diversas fontes incluindo a transição endotelial fibroblástica. Neste trabalho, quantificamos a imunexpressão da proteína S100A4 nos fibroblastos associados ao câncer em melanomas cutâneos caninos, verificamos a potencial contribuição das células endoteliais na gênese desta população e correlacionamos os achados com parâmetros patológicos, incluindo a microdensidade vascular.

Quarenta e oito casos de melanoma dermais caninos (21 epitelióides, 14 fusiformes e 13 mistos) previamente categorizados nos níveis de Clark 4, 5 e até 4 foram submetidos a imunofluorescência dupla utilizando os anticorpos primários α -SMA, fator de Von Willebrand (vWF) e S100A4 objetivando-se caracterizar os fibroblastos associados ao câncer e a contribuição da transição endotelial mesenquimal. Os melanomas não pigmentados foram caracterizados pela imunoistoquímica utilizando-se os anticorpos vimentina, pancitoqueratina, S100 e Melan A. A densidade microvascular foi analisada utilizando-se a técnica de imunofluorescência e o anticorpo primário anti-fator de Von Willebrand. O cálculo do número de vasos foi realizado selecionando-se cinco campos microscópicos de 200x contendo o maior número de vasos. O

percentual de expressão da proteína S100A4 foi calculado através da técnica de segmentação de conglomerados de cor.

Apenas um caso demonstrou co-expressão dos marcadores α -SMA e fator de Von Willebrand restritos a miofibroblastos estromais localizados nas regiões peri-tumorais e peri-anexiais. A expressão de S100A4 apresentou diferença significativa entre os três histotipos sendo que os melanomas mistos demonstraram o menor percentual de expressão. Ademais, alguns melanócitos neoplásicos, principalmente nos melanomas fusiformes, demonstraram marcação positiva para o marcador S100A4. Não houve diferença significativa entre a densidade microvascular e os histotipos; densidade microvascular e expressão de S100A4 e os níveis de Clark e expressão de S100A4.

Apesar de apenas um caso demonstrar co-expressão dos marcadores para miofibroblastos (α -SMA) e endotélio (vW) sugerindo que a transição endotelial fibroblástica possa de fato constituir uma potencial fonte de fibroblastos associados ao câncer, outros estudos envolvendo a utilização de outros marcadores são necessários para a melhor compreensão do papel da transição endotelial mesenquimal nos melanomas cutâneos.

ABSTRACT

Skin melanoma is one of the most common skin neoplasm seen in humans and dogs. Tumor microenvironment is composed by cancer cells and stromal cells that interacts to guarantee tumor progression. Cancer associated fibroblasts (CAF) represents a heterogeneous cell population characterized by expression of several markers including α -SMA and S100A4 proteins. These cells are thought to derive from different sources including endothelial-to-fibroblast transition. Here we characterize CAF in canine skin melanomas, verify the potential contribution of the endothelial cells to this population and correlate findings to pathological parameters, including microvascular density (MVD). Forth-eight cases of canine dermal melanomas (21 epithelioid, 14 spindle and 13 mixed) classified under Clark's level 4 and 5 were submitted to a double immunofluorescence assay using primary antibodies α -SMA, Von Willebrand Factor (vWF) and S100A4 in order to characterize cancer associated fibroblasts and verify the contribution of endothelial to fibroblast transition. Non-pigmented samples were characterized by immunohistochemistry using primary antibodies pan-cytokeratin, vimentin, S100 and Melan A. Microvascular density was evaluated by immunofluorescent assay using vWF and by calculating total number of vessels in five 200x fields ("hotspots"). S100A4 imunoexpression was calculated using K-means clustering segmentation method.

Only one case showed α -SMA and vWF co-expression restricted to myofibroblasts in tumor stroma. The cells were predominantly peritumoral and periadnexal. S100A4 expression was significantly different among three histotypes with mixed melanomas displaying lesser percentage of positive cells. Some neoplastic cells mainly in spindle cell melanomas were also positive for

S100A4. There were no significant differences between MVD/histotypes, MVD/S100A4 expression and Clark's level/ S100A4 expression.

In this study we observed only one case co-expressing both myofibroblast (α -SMA) and endothelial (vWF) markers suggesting that endothelial to fibroblast transition could indeed constitute a potential source of carcinoma associated fibroblasts in spontaneous skin melanomas. The role of endothelial to fibroblast transition in melanoma progression need further studies including the use of other immunohistochemical markers.

Sumário

Capítulo 1.....	9
Revisão de literatura.....	10
Melanoma cutâneo e dermatopatologia comparada	11
Estroma tumoral e fibroblastos associados ao câncer	15
Transição endotelial mesenquimal	22
Transição endotelial mesenquimal e fibroblastos associados ao câncer	26
Angiogênese tumoral e densidade microvascular	30
Importância do estudo.....	35
Objetivos	36
Hipótese do estudo	37
Referências	38
Capítulo 2.....	49
Title	50
Abstract	51
Background	54
Results	56
Discussion	59
Conclusion	62
Methods	63
Author's contribution/acknowledgments/author details	69
References	70
Tables	74
Figures	76
Conclusão final	81
Apêndice I - Ilustrações	82
Apêndice II – Análise estatística	85

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

Melanoma cutâneo e dermatopatologia comparada

As neoplasias de ocorrência espontânea em animais representam excelentes modelos comparativos em termos de carcinogênese multifatorial compartilhando aspectos clínico-patológicos similares aqueles observados na espécie humana (VAIL EM *et al.*, 2000; SMITH SH *et al.*, 2002).

As neoplasias cutâneas representam um dos tipos de câncer mais comumente diagnosticados na espécie humana (SIEGEL R *et al.*, 2012). Em 2011, nos EUA, a incidência estimada de melanomas cutâneos foi de 70.230 novos casos com 8.790 óbitos registrados no banco de dados do National Cancer Institute (NCI).

O melanoma representa a sexta neoplasia mais comum nos EUA, apresentando incidência crescente nas últimas décadas na Europa e Austrália (LINOS E *et al.*, 2009). Em cães, é responsável por 7% de todas as neoplasias malignas, estando relacionado a um prognóstico reservado (SMITH SH *et al.*, 2002).

A conversão neoplásica dos melanócitos normais é um processo de múltiplas etapas. Atualmente, acredita-se que mais de 65% dos melanomas cutâneos humanos ocorram secundariamente a mutações induzidas pela radiação ultravioleta (SMITH SH *et al.*, 2002); apesar dos mecanismos envolvidos na iniciação e progressão dos melanomas caninos serem pouco conhecidos, acredita-se que alterações na expressão de genes associados aos melanomas humanos incluindo *P53*, *C-MYC*, *C-ERB-B-2*, *C-YES*, *C-KIT* e *RAS* possam também estar presentes nos casos em cães (GROSS *et al.*, 2005; SMITH SH *et al.*, 2002).

Os melanócitos derivam de um grupo de células embrionárias migratórias, denominado crista neural. A crista neural surge durante a gastrulação na zona entre o ectoderma neural e não-neural originando os osteócitos, condrócitos e neurônios sensoriais. As células da crista neural, inicialmente multipotentes, tornam-se gradualmente comprometidas com linhagens específicas. Na embriogênese, os melanoblastos, oriundos de uma linhagem melanocítica-glial bi-potente, migram em direção a epiderme e folículos pilosos, locais nos quais se diferenciam em células maduras caracterizadas pela produção de melanina e expressão de proteínas específicas (UONG A *et al.*, 2010; GROSS TL *et al.*, 2005; SMITH SH *et al.*, 2002). Os melanócitos normais e neoplásicos expressam níveis variados das proteínas S100, Melan A, MART-1, MITF-M, tirosinase, HMB-45, TRP-1 e TRP-2 as quais podem ser utilizadas no diagnóstico imunoistoquímico dos melanomas não pigmentados ou amelanóticos (GROSS TL *et al.*, 2005).

No passado, diferentes sistemas de classificação foram utilizados em medicina e medicina veterinária na categorização das lesões melanocíticas (GROSS TL *et al.*, 2005). Em dermatologia humana, a designação *nevus* refere-se à melanócitos com alterações histopatológicas e bioquímicas características não encontrando aplicação em medicina veterinária (SMITH SH *et al.*, 2002). De acordo com o sistema de classificação terminológica revisado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a designação melanocitoma engloba todas as variantes neoplásicas benignas congênitas ou adquiridas, originárias de melanócitos; o termo melanoma refere-se à contraparte maligna (GROSS TL *et al.*, 2005). Entretanto, na literatura existem inúmeros relatos de caso envolvendo entidades morfológicas distintas que não se enquadram na

classificação oficial incluindo os melanoacantomas e hiperplasias melanocíticas (*lentigo* e *lentigo simplex*).

As manifestações dermatológicas dos melanomas cutâneos em cães incluem lesões em domo, nódulos sésseis, pólipos ou placas apresentando graus variados de pigmentação (SMITH SH *et al.*, 2002). A maioria dos casos são caracterizados por lesões com 1 a 3 cm de diâmetro localizadas principalmente nos lábios, pálpebras, membros e tronco de animais com pele pigmentada e idade entre 9 e 11 anos (GROSS *et al.*, 2005).

As características histológicas dos melanomas cutâneos caninos são variáveis. O nível de invasão, isto é epidérmico e/ou dérmico, caracteriza os termos composto, dérmico ou juncional; a infiltração da epiderme por ninhos de células neoplásicas define o padrão pagetóide, presente principalmente nos melanomas epitelióides (SMITH SH *et al.*, 2002). A maioria dos melanomas apresenta proporções variadas de células fusiformes, redondas e poligonais, sendo incomuns casos com apenas um tipo celular (GROSS *et al.*, 2005).

Os melanomas epitelióides caracterizam-se por células dispostas em ninhos ou mantos e exibem citoplasma eosinofílico, vítreo e pálido, frequentemente com limites distintos. Os núcleos são grandes e o nucléolo proeminente. Nos melanomas fusiformes, as células estão dispostas em feixes multidirecionais e caracterizam-se por limites celulares pouco definidos, núcleos pleomórficos grandes, alongados e nucléolos distintos. Os melanomas mistos consistem em ambos os padrões celulares. Outros tipos menos comuns incluem o melanoma de células dendríticas, exclusivamente cutâneo e caracterizado por células dispostas em espirais concêntricas, frequentemente em padrão de impressão digital e o melanoma de células balonosas (SMITH

SH *et al.*, 2002; GROSS TL *et al.*, 2005). Em humanos, os melanomas cutâneos são classificados de acordo com o padrão de crescimento radial ou vertical em melanoma disseminante superficial, nodular, lentigo maligna melanoma e melanoma lentiginoso acral (SMITH SH *et al.*, 2002).

Os critérios histológicos de malignidade utilizados no diagnóstico e que se correlacionam ao prognóstico são regularmente atualizados em medicina humana. Ao contrário, em medicina veterinária há uma escassez de informação científica periódica. Estudos recentes têm descrito que a atividade mitótica nos melanomas cutâneos com pior prognóstico geralmente é alta (>3 mitoses/10 cma). Outros critérios histológicos que se correlacionam com prognóstico desfavorável incluem atipia nuclear ($\geq 20\%$ de núcleos atípicos/200 células), grau de pigmentação, nível de invasão dérmica e o índice de proliferação celular Ki67 (SPANGLER WL *et al.*, 2006). Em humanos, os indicadores prognósticos utilizados no estadiamento dos melanomas cutâneos e capazes de estimar a sobrevida de 5-10 anos com um nível de confiança de 95% incluem o índice de Breslow, nível de Clark, ulceração, angiogênese tumoral, invasão vascular, células microssatélites, índice mitótico, infiltração linfocítica tumoral, regressão tumoral e metástases (SMITH SH *et al.*, 2002; HOMSI J *et al.*, 2005). O nível de Clark tem sido usado na classificação do nível de invasão tumoral das estruturas cutâneas e subcutâneas. O nível I denota um crescimento intra-epidérmico e integridade da membrana basal; no nível II há invasão da derme papilar; no nível III, a derme papilar está preenchida por melanócitos neoplásicos que alcançam a transição com a derme reticular; o nível IV e V são caracterizados pela invasão da derme reticular e hipoderme, respectivamente (HOMSI J *et al.*, 2005).

Atualmente, as neoplasias são consideradas órgãos funcionais compostos por diversos tipos de células e moléculas interagindo de uma forma dinâmica e interdependente influenciando em última instância o crescimento, invasão e metástase tumoral (HANNA E *et al.*, 2009; ANDERBERG C *et al.*, 2009).

Estroma tumoral e fibroblastos associados ao câncer

O estroma ou microambiente tumoral é de fundamental importância na carcinogênese, modulando o desenvolvimento, diferenciação e proliferação das células neoplásicas (LIU M *et al.*, 2011). O termo “estroma tumoral” implica os aspectos estruturais e topográficos restritos às células não-neoplásicas. Em contrapartida, o “microambiente tumoral” refere-se à constelação estrutural e funcional de células neoplásicas e não-neoplásicas, além dos componentes extracelulares incluindo as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento derivados de ambas as populações celulares (RUITER D *et al.*, 2002). O estroma dos tecidos normais atua como uma barreira a promoção da tumorigênese impedindo a proliferação celular tumoral. Nas neoplasias o estroma torna-se ativado em resposta a sinais moleculares oriundos das células neoplásicas e outros tipos celulares do hospedeiro contribuindo para a iniciação e promoção tumoral (SHIMODA M *et al.*, 2010).

O microambiente ou estroma tumoral é composto por componentes da matriz extracelular, células endoteliais, células derivadas da medula óssea, miofibroblastos e fibroblastos (figura 1) (SHIMODA M *et al.*, 2010; LIU M *et al.*, 2011; De WEVER *et al.*, 2008).

Os fibroblastos são constituintes integrais do tecido conjuntivo atuando na síntese dos componentes da matriz extracelular incluindo colágeno, fibronectina e laminina (BARNAS JL *et al.*, 2010). O fenótipo é heterogêneo e caracterizado principalmente por processos fusiformes a estrelados e pela aderência *in vitro* a placas de cultivo celular, estando presentes nos tecidos em reparação, fibrose ou neoplásicos (LIU M *et al.*, 2011). Os fibroblastos representam uma das populações mais abundantes do microambiente neoplásico podendo atingir até 70% da massa tumoral nos carcinomas colônicos, gástricos, mamários, pancreáticos e prostáticos (GONDA TA *et al.*, 2009). Há substancial evidencia de que os fibroblastos associados ao câncer contribuam para o crescimento, metástase, imunossupressão local e angiogênese tumoral em uma série de neoplasias (BARNAS JL *et al.*, 2010; van MEETEREN LA *et al.*, 2012). A estrutura formada pelos fibroblastos

associados ao câncer é capaz de direcionar a migração das células tumorais mediada pela secreção de fatores proteolíticos, sinais parácrinos e interações celulares heterotípicas (DE WEVER *et al.*, 2008).

As interações tumor-estroma são importantes na ativação dos fibroblastos estromais. As primeiras evidências do sinergismo entre as células neoplásicas e estromais na progressão tumoral vieram da constatação de que a conversão maligna de células epiteliais mediante a infecção com poliomavírus ocorria estritamente quando co-cultivadas com células mesenquimais induzidas (DAWE CJ *et al.*, 1966). Posteriormente, outros estudos demonstraram que as células neoplásicas seriam responsáveis pela ativação e manutenção dos fibroblastos produtores de fatores de crescimento e citocinas responsáveis por manter a progressão e angiogênese tumorais (CIRRI P *et al.*, 2011). A exposição a fatores solúveis derivados de células neoplásicas, i.e. meio condicionado, líquido ascítico maligno ou co-cultivo, é capaz de converter fibroblastos estromais a células ativas capazes de influenciar a progressão tumoral (GONDA TA *et al.*, 2009; SHIMODA M *et al.*, 2010). Ainda, fibroblastos extraídos de pacientes com doenças relacionadas à fibrose excessiva perpetuam vias de sinalização autócrina mediadas pelo TGF- β mantendo o fenótipo estromal ativado *in vitro* (SHIMODA M *et al.*, 2010). Nos melanomas, o aumento na capacidade de invasão e comportamento tumorigênico é dependente da presença concomitante de fibroblastos *in vivo* (LABROUSSE AL *et al.*, 2003). Portanto, fica claro a importância do estroma na manutenção dos tumores como entidades dinâmicas.

Há importantes diferenças biológicas tanto em *in vivo* como *in vitro* entre os fibroblastos normais e aqueles associados ao câncer. Alguns tumores

malignos podem ser convertidos em lesões morfológicamente benignas na presença de fibroblastos normais; opostamente, fibroblastos transformados podem induzir células normais à conversão neoplásica maligna (LIU M *et al.*, 2011). Apesar disso, os fibroblastos presentes nos processos de reparação e fibrose tecidual, bem como no câncer apresentam características comuns (CIRRI *et al.* 2011). Interessantemente, embora os fibroblastos associados ao câncer desempenhem papel central na manutenção tumoral e estejam irreversivelmente ativados, não apresentam características de células neoplásicas (APRELIKOVA O *et al.*, 2011; LIU M *et al.*, 2011; CIRRI P *et al.*, 2011).

Os fibroblastos associados ao câncer são um grupo de células heterogêneo sendo também denominados fibroblastos reativos, fibroblastos peritumorais, miofibroblastos ou simplesmente fibroblastos associados aos carcinomas (De WEVER O *et al.*, 2008; RÄSÄNEN A. *et al.* 2010; XING F *et al.*, 2010) podendo ser os constituintes predominantes no microambiente tumoral (BARNAS JL *et al.*, 2010). A terminologia heterogênea reflete os papéis complexos e ainda não compreendidos que os fibroblastos assumem no desenvolvimento e progressão neoplásica (LIU M *et al.*, 2011).

A presença de uma ou mais populações específicas demonstrando imunofenótipos distintos (FRANCO OE *et al.* 2010) pode ser importante no processo de carcinogênese (ANDERBERG C *et al.*, 2009). Os marcadores moleculares α -SMA, γ -SMA, FSP1, FAP, PGDFR β , NG2, paladina 4lg, podoplanina, desmina, endosialina, caderina 11, vimentina, colágeno tipo I, D7-FIB, CD90 (Thy-1) e P4H (SUGIMOTO *et al.* 2006; De WEVER *et al.*, 2008; GONDA TA *et al.*, 2009 BARNAS JL *et al.*, 2010; LIU M *et al.*, 2011) são os

mais utilizados na caracterização deste tipo celular; entretanto, nenhum é capaz de identificar todos os subtipos celulares (ANDERBERG *et al.*, 2009; RÄSÄNEN A. *et al.* 2010). A proteína de ativação dos fibroblastos (FAP) é importante na degradação da membrana basal e dos constituintes da matriz extracelular nos melanomas cutâneos (LABROUSSE AL *et al.*, 2003). Um traço molecular característico dos fibroblastos estromais em lesões melanocíticas é a ativação da FAP e a secreção de outros fatores incluindo IGF1, bFGF e TGF- β (LABROUSSE AL *et al.*, 2003).

Um subtipo de especial interesse são os miofibroblastos, inicialmente descritos por Giulio Gabbiani e colaboradores como células expressando fibras contráteis responsáveis pela aproximação dos bordos de lesões em tecidos de granulação (GABBIANI G *et al.*, 1971).

Os miofibroblastos são considerados o subtipo predominante de fibroblastos associados ao câncer (SHIMODA M *et al.*, 2010), caracterizados por apresentar características peculiares (DE WEVER *et al.*, 2008). Em condições patológicas os fibroblastos quiescentes são convertidos a miofibroblastos com capacidade contrátil e migratória, além de aumento na síntese de matriz extracelular e modulação do estroma através da secreção de metaloproteinases da matriz e seus inibidores, fibronectina, fatores de crescimento, citocinas e expressão de receptores (DE WEVER *et al.*, 2008; LIU M *et al.*, 2011). Ainda, os miofibroblastos demonstram maior capacidade de recrutamento de células progenitoras endoteliais e indução da angiogênese através da secreção de SDF1 (ORIMO A *et al.*, 2005).

Os miofibroblastos caracterizam-se pela co-expressão α -SMA/FAP, por secretar altos níveis de fatores de crescimento, proteases e moduladores da

resposta imune (LIU M *et al.*, 2011; DE WEVER *et al.*, 2008; FRANCO OE *et al.*, 2010). A geração de miofibroblastos diferenciados depende do acúmulo local de TGF- β 1 biologicamente ativo, presença de proteínas especializadas da matriz extracelular, por ex. fibronectina, e estresse mecânico oriundo das propriedades da matriz extracelular e atividade de remodelamento (HINZ B *et al.*, 2007).

A sequência de eventos gerais relacionados à diferenciação miofibroblástica é bem definida. Normalmente, os fibroblastos apresentam quantidades mínimas ou ausentes de actina citoplasmática e sintetizam pouca matriz extracelular. A ativação é induzida por citocinas secretadas por células inflamatórias, residentes e epiteliais malignas e pelo estresse mecânico gerado pela remodelação constante da matriz extracelular. Os fibroblastos ativados sintetizam filamentos contráteis de actina citoplasmática tornando-se protomiofibroblastos. Posteriormente, a expressão *de novo* de α -SMA confere maior capacidade contrátil ao protomiofibroblasto, denominado então miofibroblasto. O miofibroblasto apresenta maior capacidade de síntese de matriz extracelular e migração tecidual (HINZ B *et al.*, 2007).

Os fibroblastos associados ao câncer podem expressar também o marcador S100A4 ou proteína específica de fibroblastos 1. A S100A4 é um membro da família S100 de proteínas ligantes de cálcio composta por mais de 20 membros distribuídos de um modo tecido-específico. Os primeiros membros da família foram descobertos no tecido cerebral adquirindo sua denominação com base na solubilidade em sulfato de amônio saturado a 100% (GARRET SC *et al.*, 2006). A descoberta simultânea por diferentes grupos de pesquisa conferiu inúmeros sinônimos a proteína incluindo metastatina (Mts1), 18A2,

pEL98, p9Ka, 42A, CAPL e calvasculina (GARRET SC *et al.*, 2006). A proteína S100A4 é considerada um marcador molecular do potencial metastático e progressão neoplásica em neoplasias colorretais, biliares, gástricas primárias, prostáticas, pancreáticas, hepatocelulares, da vesícula urinária, nos carcinomas de células escamosas esofágicos, pulmonares de não pequenas células e melanomas, apresentando alto significado prognóstico (HELFMAN DM *et al.*, 2005; GARRET SC *et al.*, 2006). A proteína S100A4 não é apenas um marcador molecular relacionado à metástase, atuando também como elemento chave na indução do fenótipo metastático (GARRET SC *et al.*, 2006).

A interação da proteína S100A4 com proteínas associadas ao rearranjo do citoesqueleto e mobilidade celular incluindo miosina não muscular II, tropomiosina não-muscular, actina e tubulina é cálcio dependente (GARRET SC *et al.*, 2006; HELFMAN DM *et al.*, 2005). A proteína S100A4 também é capaz de promover a apoptose, atuando no gene *P53* e genes-alvo correspondentes incluindo *P21/WAF*, *BAX*, trombospodina 1 e *MDM-2* (HELFMAN DM *et al.*, 2005).

A capacidade pró-angiogênica *in vivo* e a influência na motilidade endotelial *in vitro* são evidências da atividade extracelular da proteína S100A4 na progressão tumoral. O crescimento e migração de estruturas capilares dependem principalmente da modulação transcripcional dos genes relacionados às metaloproteinases e seus inibidores pela proteína S100A4, permitindo a degradação da matriz extracelular e sua interação com outras proteínas relacionadas à motilidade celular (HELFMAN *et al.*, 2005).

Apesar do exposto, a disponibilidade de informações referentes aos mecanismos genéticos envolvidos na diferenciação/trans-diferenciação dos

fibroblastos associados ao câncer ainda é escassa (LIU M *et al.*, 2011). Entretanto, estudos recentes têm indicado que alterações gênicas são extremamente raras, tornando as alterações epigenéticas (metilação, instabilidade de microsátélites e senescência celular) (SHIMODA M *et al.*, 2010; LIU M *et al.*, 2011;) e os mecanismos regulatórios pós-transcricionais por MicroRNA os candidatos mais prováveis (APRELIKOVA A *et al.*, 2011). Os fibroblastos associados ao câncer isolados de diferentes tumores demonstram diferentes expressões de genes para inúmeros fatores de crescimento, citocinas e enzimas (SHIMODA M *et al.*, 2010).

Transição endotelial mesenquimal

A transição endotelial-mesenquimal é uma forma especial de transição epitelial-mesenquimal caracterizada pela trans-diferenciação das células endoteliais induzida por fatores fisiológicos ou patológicos (CHI *et al.*, 2003; ARCIENIEGAS E *et al.*, 2006; POTENTA S *et al.*, 2008).

A transdiferenciação das células endoteliais em mesenquimais é considerada um processo fundamental na embriogênese normal, atuando principalmente na formação cardíaca e maturação vascular no adulto (ARCIENIEGAS E *et al.*, 2007; KOKUDO T *et al.*, 2008). Entretanto, participa também em desordens fibrogênicas progressivas caracterizadas por acúmulo de miofibroblastos e produção exagerada e descontrolada de matriz extracelular (PIERA-VALASQUEZ S *et al.*, 2011).

O tubo cardíaco primordial consiste em um endocárdio interno e um miocárdio externo, originários de células mesodérmicas cardiogênicas, separados por uma camada acelular de matriz extracelular denominada geléia

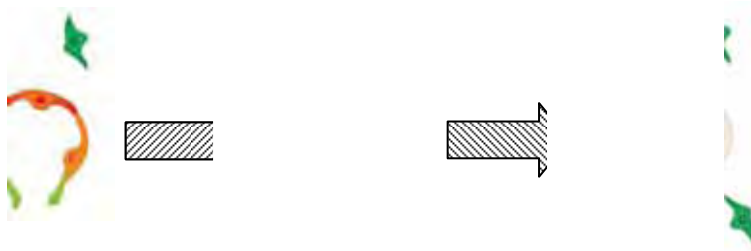
cardíaca. Após a formação dos coxins endocárdicos sinais parácrinos dos cardiomiócitos localizados no canal atrioventricular e no trato de saída estimulam a transdiferenciação das células endocárdicas em células mesenquimais via transição endotelial-mesenquimal culminando na formação dos primórdios das valvas atrioventriculares e septos membranosos interventriculares (GOUMANS MJ *et al.*, 2008; KOKUDO T *et al.*, 2008).

Com base em métodos de análise histológica e ultra-estrutural, os primeiros estudos propondo uma relação entre as células endoteliais e mesenquimais cardíacas foram realizados em embriões de animais por Markwald RR e colaboradores. Estudando embriões de 16 a 18 somitos, os autores propuseram que as células endoteliais se constituiriam em células progenitoras do mesênquima cardíaco uma vez que ambas apresentavam similaridades citoplasmáticas e localizavam-se em estrita adjacência (MARKWALD RR *et al.*, 1977)

Em 2004, Armstrong EJ e colaboradores propuseram um modelo descrevendo as vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento das valvas cardíacas através do processo de transição endotelial-mesenquimal. Inicialmente, células endocárdicas especificamente competentes são estimuladas a iniciar o programa de transição diretamente via Notch e/ou indiretamente por fatores de crescimento (p.ex. BMP-4) e elementos estruturais controlados pela ativação da via Wnt/ β -catenina. Subsequentemente há a diminuição na expressão da proteína de adesão caderina VE induzida pelos fatores de transcrição mesenquimal Snail e Slug estimulados pelo TGF- β e restrita as células previamente destinadas à transição. Concomitantemente, a atuação do VEGF limita o processo de trans-diferenciação e aumenta a

proliferação de células endoteliais contribuindo para a renovação e manutenção do endotélio (ARMSTRONG EJ *et al.*, 2004). As células endoteliais sofrem delaminação da monocamada e migram em direção a matriz subjacente (CAMENISCH TD *et al.*, 2002). Mais adiante, os fatores TGF- β , BMP, cErbB-2 e cErbB-3 atuam sinergicamente na promoção da trans-diferenciação mesenquimal e formação do mesênquima cardíaco. Entretanto, é necessário que o processo seja auto-limitante visando permitir o remodelamento posterior e a formação do tecido fibroso cardíaco. A neurofibromina é o fator responsável por inibir a via de sinalização Ras, limitando a extensão da transição endotelial-mesenquimal e, em última instância, contribuindo para o remodelamento cardíaco (ARMSTRONG EJ *et al.*, 2004).

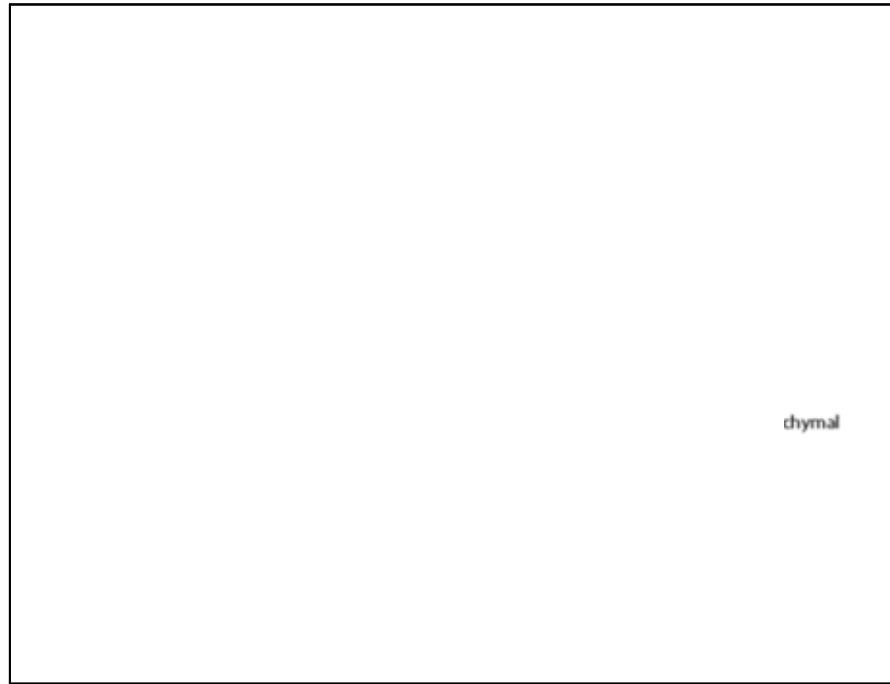
Durante a trans-diferenciação mesenquimal há alteração na expressão celular de inúmeras proteínas específicas (figura 2) (ARCINIEGAS E. *et al.*, 2007). As células endoteliais caracterizadas por um fenótipo positivo para caderina VE, Tie-1, Tie-2 VEGFR-1, VEGFR-2, PECAM-1, zona occludence-1 e fator VIII adquirem um fenótipo mesenquimal ou fibroblástico/miofibroblástico caracterizado pela expressão de α -SMA, vimentina, FSP-1, pró-colágeno tipo I, colágeno tipo I e III, calponina, N-caderina, fibronectina e/ou vitronectina (EISENBERG LM *et al.*, 1995; LIEBNER S *et al.*, 2004; ARCINIEGAS E *et al.*, 2007; GOUMANS MJ *et al.*, 2008; POTENTA S *et al.*, 2008; ZEISBERG EM *et al.*, 2008; VELASQUEZ –PIERA *et al.*, 2011; van MEETEREN LA *et al.*, 2012).



Transição endotelial mesenquimal e fibroblastos associados ao câncer

A diversidade na expressão de marcadores moleculares talvez possa ser explicada, em parte, pelas prováveis origens dos fibroblastos associados ao câncer (CIRRI P *et al.*, 2011).

Em condições normais, os fibroblastos adultos são diretamente derivados de células mesenquimais e aumentam em número somente pela proliferação de fibroblastos residentes. Já os fibroblastos e miofibroblastos associados ao câncer podem ser derivados de precursores da medula óssea, células endoteliais, mioepiteliais, epiteliais neoplásicas, fibroblastos, células musculares lisas, estreladas, pericitos e adipócitos (figura 3) (KALLURI *et al.*, 2006; De WEVER O *et al.*, 2008; ANDERBERG *et al.*, 2009; ZEISBERG EM *et al.*, 2007a; KARNOUB AE *et al.*, 2007).



MSC,
lys for

Em bases gerais, as teorias mais aceitas atualmente incluem a diferenciação de populações residuais de fibroblastos estromais em miofibroblastos sem, no entanto, portar alterações gênicas (1); recrutamento estromal e transdiferenciação de células progenitoras especializadas circulantes tais como fibrócitos, células-tronco e hematopoiéticas (2); expansão clonal de populações específicas de miofibroblastos pré-existentes (3); seleção e expansão clonal de populações de fibroblastos portadoras de alterações gênicas como, por exemplo, inativação do gene *P53* e *PTEN* (teoria mutacional); transição epitelial-mesenquimal (5) e transição endotelial mesenquimal (6) (SHIMODA M *et al.*, 2010; LIU M *et al.*, 2011).

A transição endotelial mesenquimal permite que células epiteliais polarizadas adquiram um fenótipo celular mesenquimal, capacidade de invasão, migração e expressão aumentada de proteínas da matriz extracelular

(LIU M *et al.*, 2011). Estudos prévios relacionados à transição endotelial mesenquimal focavam sua participação no desenvolvimento embrionário cardíaco; entretanto evidências experimentais recentes sugerem que o processo de transição também ocorra em uma variedade de doenças, incluindo a fibrose cardíaca e as neoplasias (XING F *et al.*, 2011). Estima-se que aproximadamente 40% dos fibroblastos associados ao câncer derivem da transição endotelial mesenquimal e que estas células assumam importante papel na angiogênese (RÄSÄNEM K *et al.*, 2010; POTENTA S *et al.*, 2008).

A fibrose cardíaca é resultado da deposição excessiva de matriz extracelular mediada por fibroblastos, diminuição na quantidade de microvasos e desorganização da estrutura miocárdica normal. Analisando camundongos duplamente transgênicos *Tie2-Cre;R26RstoplacZ* submetidos a constrição aórtica, os autores evidenciaram células *lacZ* (o gene *lacZ* é expresso somente em células endoteliais independentemente das alterações fenotípicas) positivas dispersas pelo tecido fibroso no miocárdio. Os achados foram corroborados posteriormente por imunofluorescência, citometria de fluxo e PCR (ZEISBERG EM *et al.*, 2007b).

Zeisberg e colaboradores obtiveram indícios da existência da transição endotelial mesenquimal nos modelos experimentais de melanoma B16F10 e carcinoma pancreático espontâneo Rip-Tag2 em camundongos transgênicos. A transição foi associada à expressão do marcador mesenquimal S100A4 e diminuição na expressão do marcador endotelial CD31/PECAM, ambos co-expressos em 40% dos fibroblastos associados ao câncer. Além disso, 11% das células co-expressavam CD31/ α -SMA. Os pesquisadores também investigaram o crescimento tumoral em camundongos transgênicos *Tie2-*

Cre;R26R-lox-STOP-lox-lacZ que permitem a marcação irreversível de todas as células endoteliais com a expressão de *lacZ*. Os fibroblastos FSP1 e α -SMA positivos apresentaram expressão de *lacZ* em 30% e 12 % dos fibroblastos associados ao câncer, respectivamente (ZEISBERG EM *et al.*, 2007a).

As vias de sinalização têm sido descritas principalmente em modelos experimentais *in vitro*. A exposição de células endoteliais humanas e murinas ao TGF- β , provavelmente secretado por células inflamatórias, e ligantes Notch demonstram atividade de transição endotelial mesenquimal (POTENTA S *et al.*, 2008; KOKUDO T *et al.*, 2008; VELASQUEZ-PIERA *et al.*, 2011). A análise gênica de modelos experimentais de fibrose cardíaca demonstrou alta expressão de mRNA do gene *TGF- β 1* e dos mediadores Smad2 e Smad3 (ZEISBERG EM *et al.*, 2007b). Células endoteliais embrionárias expostas ao TGF- β 2 demonstraram redução na expressão de claudina 5 e aumento na expressão de marcadores mesenquimais (KOKUDO T *et al.*, 2008) ou co-expressavam marcadores endoteliais e mesenquimais (MEDICI D *et al.*, 2010). Ainda, não está claro o papel desempenhado por ambas as vias em condições *in vivo*. Acredita-se que outras vias de sinalização incluindo VEGF, NFAT, BMP, Wnt/ β -catenina, ErbB e NF1/Ras, descritas na embriogênese cardíaca (ARMSTRONG EJ *et al.*, 2004), possam interagir também na transição endotelial mesenquimal no contexto da carcinogênese (POTENTA S *et al.*, 2008).

As vias de transcrição associadas à transição endotelial mesenquimal são pouco conhecidas. Células em transição demonstraram maior expressão de fatores de transcrição repressores da família Snail1 diminuindo a expressão de caderina VE nas células endoteliais e permitindo sua migração e

transdiferenciação (POTENTA S *et al.*, 2008; VELASQUEZ-PIERA *et al.*, 2011). Acredita-se que as vias Twist, CBF-A e KAP-1, envolvidas na transição epitélio mesenquimal, também possam estar envolvidas na transição endotelial mesenquimal.

A presença de células tumorais incorporadas aos vasos, formando um verdadeiro mosaico e participando no processo de progressão tumoral é descrita por alguns autores (SELEK L *et al.*, 2011). A capacidade das células neoplásicas em adquirir um fenótipo similar àquele das células endoteliais representa uma área de pesquisa recente no contexto da transição endotelial mesenquimal (SELEK L *et al.*, 2011). Ocasionalmente, as células endoteliais associadas ao tumor e outros componentes vasculares demonstram perda da heterozigose ou as mesmas alterações gênicas das células tumorais (SAJITHLAL GB *et al.*, 2010). As potenciais origens destas células em mosaico incluem a fusão das células tumorais e endoteliais, fagocitose do núcleo ou cromossomos das células tumorais pelas células endoteliais ou a transdiferenciação direta das células tumorais por um processo semelhante à mimetização vasculogênica (SAJITHLAL GB *et al.*, 2010).

Angiogênese tumoral e densidade microvascular tumoral

Os microvasos normais consistem em arteríolas, capilares e vênulas com arquitetura vascular organizada, regular e funcional. Em contrapartida, os vasos que compõe as neoplasias são tortuosos, dilatados, saculares, heterogêneos e com padrão de ramificação não-dicotômico, reflexo do desequilíbrio entre os fatores pró e anti-angiogênicos (FUKUMURA D *et al.*, 2007).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas relacionado a mudanças genéticas e epigenéticas nas células tumorais e no microambiente tumoral (FAN F *et al.*, 2012). O equilíbrio entre a secreção de moléculas pró-angiogênicas e anti-angiogênicas pelas células tumorais e estromais é perdido durante a carcinogênese contribuindo para a ativação angiogênica. O aumento na densidade vascular é estimulado pela super-expressão de oncogenes relacionados a proteínas angiogênicas incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial (EGF), ácido lisofosfático (LPA) e angiopoietina (Ang) ou pela diminuição na expressão de fatores inibitórios tais como a angiostatina, endostatina e trombospondina (FAN F *et al.*, 2012; RIBATTI *et al.*, 2008).

A vasculatura tumoral apresenta duas origens extratumorais distintas denominadas angiogênese e vasculogênese. Ambos os processos referem-se à formação de novos vasos sanguíneos durante os processos de reparação tecidual e crescimento tumoral. A angiogênese é um processo específico no qual há o brotamento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes próximos a neoplasia (FOLKMAN J *et al.*, 2003; TANG D *et al.*, 2004). Na vasculogênese há o recrutamento e diferenciação de células progenitoras, hemangioblastos e mesângioblastos, para o interior do leito vascular tumoral (TANG D *et al.*, 2004). A manutenção, crescimento e metástase das diferentes neoplasias são diretamente dependentes do suprimento sanguíneo, fato corroborado pela limitação do tamanho tumoral máximo atingido na ausência de vasos (PENG F *et al.*, 2010). A angiogênese é importante por suprir as demandas de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento, hormônios e

enzimas proteolíticas que controlam a coagulação e o sistema de fibrinólise, além da disseminação de células tumorais (RIBATTI D *et al.*, 2008).

A densidade microvascular intratumoral é uma medida quantitativa da angiogênese neoplásica que visa auxiliar na avaliação do estágio clínico, probabilidade de ocorrência de metástase, taxa de recorrência, tempo de sobrevida e planejamento terapêutico (HLATKY L *et al.*, 2002). Os primeiros estudos de correlação entre a intensidade da angiogênese e agressividade tumoral baseavam-se nas características das células endoteliais e na mensuração da densidade vascular em amostras de neoplasias cerebrais humanas (BREM S *et al.*, 1972).

Com o progredir da ciência, diversas metodologias com diferentes níveis de sensibilidade foram desenvolvidas para mensuração da microdensidade vascular intratumoral (WEIDNER *et al.*, 1995). O advento das técnicas de detecção imunoistoquímica intensificou os estudos relacionados à vascularização neoplásica (HLATKY L *et al.*, 2002). Na década de 90 um grupo de pesquisadores desenvolveu uma metodologia de quantificação rápida, reproduzível e mais objetiva correlacionando a extensão da angiogênese às taxas de metástase (WEIDNER *et al.*, 1991, 1992, 1993, 1995). A técnica consistia na seleção de amostras representativas de carcinomas mamários e prostáticos e na imunomarcagem das células endoteliais microvasculares com anticorpo específico anti Fator de Von Willebrand. A mensuração da densidade vascular intratumoral envolvia a contagem do número de vasos em uma área de 0,74 mm² sob aumento de 200x, evitando-se áreas hipocelulares, escleróticas ou adjacentes a tecidos normais (WEIDNER *et al.*, 1995). O método demonstrou que a densidade microvascular consistia em um indicador

prognóstico significativo em neoplasias mamárias e prostáticas (KUMAR V *et al.*, 2010) assim como em outras neoplasias (HLATKY L *et al.*, 2002). Entretanto, a associação entre a densidade microvascular intratumoral e os parâmetros clínico-patológicos nos melanomas humanos é controversa (KISS J *et al.*, 2007).

Fatores intrínsecos aos melanomas e a metodologia de análise utilizada podem influenciar consideravelmente a estimativa da angiogênese tumoral e a correlações clínico-patológicas. A densidade microvascular varia de acordo com a região tumoral ou peritumoral considerada, espessura tumoral (MASSI *et al.*, 2010), distância do front de invasão, limite tumor-estroma, área da fase de crescimento vertical, bem como vasos próximos a áreas ulceradas ou necróticas (DÖME B *et al.*, 2002; SRIVASTAVA *et al.*, 1988; KISS J *et al.*, 2007; MASSI D *et al.*, 2010). Alguns estudos sugerem ainda que somente a mensuração da densidade microvascular não represente isoladamente o potencial angiogênico tumoral e, portanto não apresente correlação com o prognóstico (VERMEULEN PB *et al.*, 1995; HILLEN F *et al.*, 2006). A co-marcação para células endoteliais e marcadores de células em proliferação é mais fidedigna na predição da angiogênese e apresenta maior valor prognóstico em melanomas cutâneos humanos (HILLEN F *et al.*, 2006).

As células endoteliais são responsáveis por revestir a superfície interna dos vasos sanguíneos e linfáticos, atuando como uma interface entre os elementos circulantes e o restante da parede vascular. Os principais marcadores imunoistoquímicos utilizados na identificação das células endoteliais em melanomas cutâneos incluem o CD105 (MASSI D *et al.*, 2010), CD31 (DÖME B *et al.*, 2002; HILLEN F *et al.* 2006), CD34 (HILLEN F *et al.*,

2006; KISS J *et al.* 2007) e a Ulex Europaeus aglutinina lectina I (SRIVASTAVA A *et al.*, 1988). Entretanto, o anticorpo mais utilizado é o fator de Von Willebrand (RIBATTI D *et al.*, 2003; KISS J *et al.*, 2007).

O fator de Von Willebrand é uma glicoproteína multimérica com peso molecular de 500 kDa até 10.000 kDa encontrada predominantemente no plasma sanguíneo, grânulos alfa das plaquetas e megacariócitos, matriz subendotelial e corpúsculos de Weibel-Palade nas células endoteliais (SADLER JE *et al.*, 1998). A expressão gênica e protéica do fator de Von Willebrand é específica e restrita as células endoteliais e megacariócitos (RUGGERI ZM *et al.*, 1993). No plasma, atua como carreador do fator VIII protegendo a coenzima da degradação proteolítica (SADLER JE *et al.*, 1998). As células imunomarcadas pelo anticorpo demonstram um padrão de marcação granular confinado ao citoplasma.

Importância do estudo

Recentemente, importantes avanços têm sido descritos na compreensão dos mecanismos patológicos relacionados à interação estroma-tumor nos melanomas cutâneos; entretanto, a aplicação clínica não tem sido extensivamente estudada.

As evidências com relação à origem dos fibroblastos em tumores humanos são escassas (ANDENBERG C *et al.*, 2009), sendo que em Medicina Veterinária não há relatos na literatura até o presente momento. Os estudos envolvendo até agora tem se baseado principalmente em modelos experimentais. Entretanto, estes modelos não são capazes de recapitular completamente as reações associadas às neoplasias (SUGIMOTO H *et al.*, 2006; ANDERBERG C *et al.*, 2009) o que torna necessário maiores pesquisas em modelos animais fidedignos capazes de desenvolver este tipo de neoplasia de forma espontânea (SMITH SH *et al.*, 2002).

Apesar da constante atualização acerca da terapêutica anti-melanoma, o tratamento efetivo ainda representa um paradoxo entre todos os tumores sólidos (SPATZ A *et al.*, 2010). A descoberta da transição endotelial mesenquimal como fonte de células estromais capazes de influenciar diretamente a progressão tumoral sugerem que a utilização de drogas anti-angiogênicas ou capazes de interferir na ativação dos fibroblastos representem uma modalidade terapêutica promissora (POTENTA S *et al.*, 2009). Portanto, a análise dos componentes estromais e da contribuição relativa das diferentes fontes, principalmente da transição endotelial mesenquimal, é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento.

Objetivo geral

Analisar a imunoexpressão do marcador S100A4 nos fibroblastos estromais associados ao câncer e verificar a contribuição da transição endotelial mesenquimal na gênese desta população de células em melanomas cutâneos espontâneos de cães.

Objetivos específicos

- 4.2.1 Verificar a associação entre os níveis quantitativos de expressão do marcador S100A4 e outras variáveis patológicas.
- 4.2.2 Verificar a associação entre a DMI e outras variáveis patológicas.
- 4.2.3 Verificar a existência e quantificar a co-expressão α -SMA/vW em células endoteliais e fibroblastos estromais e analisar a correlação com as variáveis patológicas.

Hipótese do estudo

A transição endotelial mesenquimal contribui com parte dos fibroblastos associados ao câncer presentes no estroma dos melanomas cutâneos espontâneos de cães. A densidade microvascular intratumoral apresenta correlação positiva com a quantidade de células co-expressando os marcadores α -SMA e fator de Von Willebrand e com outros parâmetros patológicos.

Referências

1. Anderberg C, Pietras K. On the origin of cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle*. 2009 May 15;8(10):1461-2.
2. Andersen K, Nesland JM, Holm R, Florenes VA, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2004 Aug;17(8):990-7.
3. Aprelikova O, Green JE. MicroRNA regulation in cancer-associated fibroblasts. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 Nov 16.
4. Arciniegas E, Neves YC, Carrillo LM. Potential role for insulin-like growth factor II and vitronectin in the endothelial-mesenchymal transition process. *Differentiation*. 2006 Jul;74(6):277-92.
5. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Jul;293(1):L1-8.
6. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res*. 2004 Sep 3;95(5):459-70.
7. Barnas JL, Simpson-Abelson MR, Yokota SJ, Kelleher RJ, Bankert RB. T cells and stromal fibroblasts in human tumor microenvironments represent potential therapeutic targets. *Cancer Microenviron*. 2010;3(1):29-47.
8. Bolander A, Agnarsdóttir M, Wagenius G, Strömberg S, Pontén F, Ekman S, Brattström D, Larsson A, Einarsson R, Ullenhag G, Hesselius

- P, Bergqvist M. Serological and immunohistochemical analysis of S100 and new derivatives as markers for prognosis in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18(6): 412-19.
9. Boni R, Burg G, Doguoglu A, Ilg EC, Schafer BW, Muller B, et al. Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *Br J Dermatol.* 1997 Jul;137(1):39-43.
10. Boni R, Heizmann CW, Doguoglu A, Ilg EC, Schafer BW, Dummer R, et al. Ca(2+)-binding proteins S100A6 and S100B in primary cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol.* 1997 Feb;24(2):76-80 (a)
11. Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst.* 1972 Feb;48(2):347-56.
12. Camenisch TD, Molin DG, Person A, Runyan RB, Gittenberger-de Groot AC, McDonald JA, et al. Temporal and distinct TGFbeta ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis. *Dev Biol.* 2002 Aug 1;248(1):170-81.
13. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 16;100(19):10623-8.
14. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):482-97.
15. Dawe CJ, Morgan WD, Slatick MS. Influence of epithelio-mesenchymal interactions on tumor induction by polyoma virus. *Int J Cancer.* 1966 Sep 15;1(5):419-50.

16. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2229-38.
17. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Vascularization of cutaneous melanoma involves vessel co-option and has clinical significance. *J Pathol*. 2002 97: 355-62, 2002.
18. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res*. 1995 Jul;77(1):1-6.
19. Fan F, Schimming A, Jaeger D, Podar K. Targeting the tumor microenvironment: focus on angiogenesis. *J Oncol*. 2012;2012:281261.
20. Folkman J. Fundamentals concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*. 2003 3(7):643-51.
21. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Feb;21(1):33-9.
22. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res*. 2007 Sep-Nov;74(2-3):72-84.
23. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971 27:549-50.
24. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):677-80.
25. Goldschmidt M, Dunstan R, Stannard A. Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals.

Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1998.

26. Gonda, TA, Varro A, Wang TC; Tycko, B. Molecular biology of cancer associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 21(1): 2-10.
27. Goumans MJ, van Zonneveld AJ, ten Dijke P. Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis? *Trends Cardiovasc Med.* 2008 Nov;18(8):293-8.
28. Grisendi G, Bussolari R, Veronesi E, Piccinno S, Burns JS, De Santis G, et al. Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers. *Am J Cancer Res.* 2011;1(6):787-805.
29. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Backwell; 2005.
30. Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4 (mts1) gene. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9): 3772-80.
31. Hanna E, Quick J, Libutti SK. The tumor microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral Dis.* 2009 Jan; 15(1):8-17.
32. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumor progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005 Jun 6; 92(11):1955-58.

33. Hillen F, Van de Winkel A, Creyten D, Vermeulen AH, Griffioen AW. Proliferation of endothelial cells, but not microvessel density are a prognostic in human cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2006; 16(5): 453-57.
34. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1807-16.
35. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jun 19;94(12):883-93.
36. Homsy J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control.* 2005 Oct;12(4):223-9.
37. Hofmeister-Mueller V, Vetter-Kauczok CS, Ullrich R, Meder K, Lukanidin E, Broecker EB, et al. Immunogenicity of HLA-A1-restricted peptides derived from S100A4 (metastasin 1) in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Aug;58(8):1265-73.
38. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006 May;6(5):392-401.
39. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007 Oct 4;449(7162):557-63.
40. Kiss J, Timar J, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, et al. Association of microvessel density with infiltrating cells in human cutaneous malignant melanoma. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(1):21-31.

41. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci.* 2008 Oct 15;121(Pt 20):3317-24.
42. Labrousse AL, Ntayi C, Hornebeck W, Bernard P. Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Mar;49(3):269-75.
43. Li J, Bertram JF. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology (Carlton).* 2010 Aug;15(5):507-12.
44. Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S, et al. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol.* 2004 Aug 2;166(3):359-67.
45. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol.* 2009 Jul;129(7):1666-74.
46. Liu M, Xu J, Deng H. Tangled fibroblasts in tumor-stroma interactions. *Int J Cancer.* 2011; 129:1795-1805.
47. Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer.* 1997 Aug 22;74(4):464-9.
48. Markwald RR, Fitzharris TP, Manasek FJ. Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat.* 1977 Jan;148(1):85-119

49. Massi D, Landriscina M, Piscazzi A, Cosci E, Kirov A, Paglierani M, et al. S100A13 is a new angiogenic marker in human melanoma. *Mod Pathol*. 2010 Jun;23(6):804-13.
50. Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med*. 2010 Dec;16(12):1400-6.
51. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Differential expression of S100 protein subtypes in malignant melanoma, and benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Cutan Pathol*. 2008 Nov;35(11):1014-9.
52. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335-48.
53. Peng F, Chen M. Antiangiogenic therapy: a novel approach to overcome tumor hypoxia. *Chin J Cancer*. 2010 Aug;29(8):715-20.
54. Petersson S, Shubbar E, Enerback L, Enerback C. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res*. 2009 Aug;19(4):215-25.
55. Petro A, Schwartz J, Johnson T. Current melanoma staging. *Clin Dermatol*. 2004 May-Jun;22(3):223-7.
56. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol*. 2011 Sep;179(3):1074-80.
57. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer*. 2008 Nov 4;99(9):1375-9.

58. Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res.* 2010 Oct 15;316(17):2713-22.
59. Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr.* 2008 Apr;3(1):29-34.
60. Ruggeri ZM, Ware J. von Willebrand factor. *FASEB J.* 1993 Feb 1;7(2):308-16.
61. Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol.* 2002 Jan;3(1):35-43.
62. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.
63. Sajithlal GB, McGuire TF, Lu J, Beer-Stolz D, Prochownik EV. Endothelial-like cells derived directly from human tumor xenografts. *Int J Cancer.* 2010 Nov 15;127(10):2268-78.
64. Selek L, Dhobb M, van der Sanden B, Berger F, Wion D. Existence of tumor-derived endothelial cells suggests an additional role for endothelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Int J Cancer.* 2011 Mar 15;128(6):1502-3.
65. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Feb;21(1):19-25.
66. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan;62(1):10-29.
67. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesse D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe

- for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 2):2787-96.
68. Smith SH, Goldschmidt MH, Macmanus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol.* 2002 39(6):651-78.
69. Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic basis for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* 2006 43:136-49.
70. Spatz A, Batist G, Eggermont AM. The biology behind prognostic factors of cutaneous melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2010 May;22(3):163-8.
71. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol.* 1988 Nov;133(2):419-23.
72. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther.* 2006 Dec;5(12):1640-6.
73. Tang DG, Conti CJ. Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2004 Feb;30(1):109-17.
74. Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol.* 2010 Jan;222(1):38-41.
75. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 2000;18(8):781-92.
76. van Meeteren LA, Ten Dijke P. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):177-86.

77. Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, Van Marck E, Goovaerts G, Huyghe M, et al. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumour cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol.* 1995 Jan;6(1):59-64.
78. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci.* 2010;15:166-79.
79. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3;324(1):1-8.
80. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992 84:1875-87.
81. Weidner N, Carrol PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol,* 1993 143:401-9.
82. Weidner, N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol.* 1995 147:9-19.
83. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10123-8. (a)
84. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007 Aug;13(8):952-61. (b)

85. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R.

Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Dec;19(12):2282-7.

Capítulo II

BMC Cancer Journal

Research article

Cancer-associated fibroblasts and correlation with pathological parameters in canine cutaneous melanomas

Fabrizio Grandi^{1,2}, Rafael Malagoli Rocha³, Noeme Sousa Rocha^{1,2}

¹ Department of Pathology, Botucatu Medical School, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brazil.

² Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, Brazil.

³ Department of Investigative Pathology, Cancer Hospital, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Fabrizio Grandi, Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. ZIP Code: 18618-970. Telephone/fax: +55 14 3811 6293. e-mail: fgrandivet@gmail.com.

E-mail addresses:

FG: fgrandivet@gmail.com

RMR: rafael.rocha@accamargo.org.br

NSR: rochanoeme@fmvz.unesp.br

Abstract

Background

Skin melanoma is one of the most common skin neoplasm seen in humans and dogs. Tumor microenvironment is composed by cancer cells and stromal cells that interacts to guarantee tumor progression. Cancer associated fibroblasts (CAF) represents a heterogeneous cell population characterized by expression of several markers including α -SMA and S100A4 proteins. These cells are thought to derive from different sources including endothelial-to-fibroblast transition. Here we characterize CAF in canine skin melanomas, verify the potential contribution of the endothelial cells to this population and correlate findings to pathological parameters, including microvascular density (MVD).

Methods

Forth-eight cases of canine dermal melanomas (21 epithelioid, 14 spindle and 13 mixed) classified under Clark's level 4 and 5 were submitted to a immunofluorescence assay using primary antibodies α -SMA, Von Willebrand Factor (vWF) and S100A4 in order to characterize cancer associated fibroblasts and verify the contribution of endothelial to fibroblast transition. Non-pigmented samples were characterized by immunohistochemistry using primary antibodies pan-cytokeratin, vimentin, S100 and Melan A. Microvascular density was evaluated by immunofluorescent assay using vWF and by calculating total number of vessels in five 200x fields ("hotspots"). S100A4 expression were calculated using K-means clustering segmentation method.

Results

Only one case showed α -SMA and vWF co-expression restricted to myofibroblasts in tumor stroma. The cells were predominantly peritumoral and periadnexal. S100A4 expression was significantly different among three histotypes with mixed melanomas displaying lesser percentage of positive cells. Some neoplastic cells mainly in spindle cell melanomas were also positive for S100A4. There were no significant differences between MVD/histotypes, MVD/S100A4 expression and Clark's level/ S100A4 expression.

Conclusions

The putative role of S100A4 as a prognostic factor in canine skin melanomas need further studies to better clarify the prognostic significance of this protein in cancer progression. In this study we observed only one case co-expressing both myofibroblast (α -SMA) and endothelial (vWF) markers suggesting that endothelial to fibroblast transition could constitute a potential source of carcinoma associated fibroblasts in spontaneous skin melanomas.

Background

Cancer consists of founder tumor cells and tumor-associated stromal cells associated to a high complex extracellular milieu that includes matrix components, growth factors and cytokines playing synergistically to ensure tumor progression. Tumor microenvironment is important in modulating development, differentiation and proliferation of neoplastic cells through paracrine signals secreted by their cellular components¹.

Fibroblasts are the most abundant cell type in normal connective tissues² and tumoral stroma of many cancers including breast, colon, pancreatic, prostate and gastric carcinomas³. The role of cancer-associated fibroblasts (CAF) in tumorigenesis is now well accepted and is established that activated fibroblasts promote tumor cell growth, increase angiogenesis, invasion and metastasis^{4,5}.

Cancer-associated fibroblasts are highly heterogeneous populations that display several immunophenotypes in varying proportions among different tumor types⁶. CAF are considered to be activated fibroblasts expressing *de novo* alpha smooth muscle actin (α -SMA) and fibroblast-specific protein 1 (FSP-1/S100A4) similar to those found in wound healing and fibrosis⁷. Although there are no fibroblastic-specific immunocytochemical marker, α -SMA and S100A4 are the most commonly used^{7,8}.

Fibroblast-specific protein 1 (S100A4) is a member of the S100 family of calcium binding proteins and has been categorized as a metastasis associated molecular marker with high prognostic significance⁹.

The main sources of S100A4 protein are host-derived stromal cells which contribute to tumor progression and metastasis as demonstrated by suppression of tumor development and metastasis in S100A4 -/- mice injected

with highly metastatic, S100A4 positive, carcinoma cell line¹⁰. In addition, S100A4 is important for the survival of metastatic cells in blood stream and foreign microenvironment¹¹.

Progenitor cells for CAF seems to have multiple origins including pericytes, vascular smooth muscle cells, myoepithelial cells, neoplastic cells, local residing fibroblasts, bone marrow-derived mesenchymal cells, adipocytes or by endothelial-to-mesenchymal transition^{5,12}.

Endothelial-to-mesenchymal transition is often categorized as a specialized form of epithelial-to-mesenchymal transition in which endothelial cells acquire a motile phenotype and a shift of endothelial to mesenchymal markers¹³.

Skin melanoma is a devastating disease frequently diagnosed both in humans and canine accounting for 0.8-2% of all skin tumors in the latter¹⁴. Canine cutaneous melanomas are classified in compound, dermal, junctional or pagetoid depending on affected skin layer and epithelioid, spindle, clear cell, round, dendritic and mixed depending on cytomorphological features¹⁵.

The aims of this study were to verify S100A4 expression in stromal fibroblasts in canine skin melanomas, analyze the potential contribution of endothelial-to-mesenchymal transition to fibroblast population and to verify a possible correlation with pathological parameters.

Results

Melanoma histotypes and Clark's level

Among the 48 cutaneous melanomas (table 1), 20 consisted entirely of epithelioid cells restricted to papillary and reticular dermis; 1 tumor was classified as compound with epithelioid melanocytes infiltrating epidermis in a pagetoid pattern. Fourteen tumors consisted of spindle type showing elongated cells in a streaming bundle pattern with large nuclei, marked anisokaryosis and frequently multiple large nucleoli. Thirteen tumors were classified as mixed; twelve consisted of spindle and epithelioid cells in varied proportions and one consisted of spindle and round cells. Degree of pigmentation varied between different morphological types. Among the 38 pigmented tumors, epithelioid type presenting higher melanin content followed by spindle and mixed cell types. Ten cases were non-pigmented. All tumors exhibited a mitotic index ≥ 3 mitoses/10 high power field and epidermal ulceration in varied degrees sometimes associated with several bacterial colonies. Round, clear, dendritic, and signet-ring cell types were not observed. Fourteen tumors showed Clark's level 4; eighteen Clark's level 5 and sixteen were classified as up to 4.

Tumoral immunophenotyping for pan-cytokeratin, vimentin, S100 and Melan A

All 48 cutaneous melanomas were positive for vimentin and S100 as a strong, diffuse and granular red staining pattern in the majority of the neoplastic cells. Immunoreactivity was confined to cytoplasm or cytoplasm/nuclei, respectively. All neoplastic cells were negative for pan-cytokeratin. Seven non-pigmented samples were positive for Melan A in tissue microarray. Three non-pigmented samples were positive only in full tissue sections.

α -SMA and vWF co-expression in estromal fibroblasts

Simultaneous immunofluorescent analysis of tumoral stroma revealed rare scattered peritumoral and intratumoral cells co-expressing both markers only in one case (figure 1). Thus, staining area could not be used for statistical analysis. Cell morphology varied from fusiform to elliptical with round to spindle regular nuclei. Peritumoral cells had a tendency to accumulate near vessels and apocrine glands.

S100A4 expression levels in melanoma histotypes

Formalin-fixed paraffin-embedded tissue from 48 primary skin melanomas (21 epithelioid, 14 spindle and 13 mixed) were analyzed by immunofluorescence for expression of the S100A4 protein. Staining pattern varied accordingly to cell type with stromal fibroblasts (figure 2) and neoplastic melanocytes displaying cytoplasmatic and cytoplasmic/nuclear green staining, respectively. Positive neoplastic cells were observed in all three histotypes; however spindle cell melanomas showed higher percentages of expression. The quantitative

analysis of positive staining areas showed a significant difference ($P<0.01$) in S100A4 expression among histotypes. S100A4 expression in epithelioid ($P<0.02$) and spindle ($P<0.01$) cell types were more prominent than in mixed.

Microvascular density, histotypes and S100A4 expression

Vessels positive for Von Willebrand factor were counted in five 200x fields comprising vascular “hotspots”. All immunohistochemical reactions were highly specific (figure 3). The quantitative analysis of microvascular density was expressed in total number of vessels per area (median/IQR) as follows: spindle (54.5/3.0), mixed (54.0/6.0) and epithelioid (43.0/7.0). There were no significant differences among MVD/histotypes ($p<0.16$) and MVD/S100A4 expression ($p=0.87$).

Level of invasion and S100A4 expression

Clark’s level were measured in H&E stained samples. Eleven cases showed Clark’s level IV and fifteen cases showed level V. Fourteen cases were classified as up to level IV since these biopsy samples didn’t have subcutaneous fat for evaluation. There were no significant differences ($p=0.31$) among Clark’s level and S100A4 expression in melanoma samples.

Discussion

Currently, there are increasing evidences that cancer-associated fibroblasts play a central role in neoplastic progression. Despite this, little is known about their origin in tumoral stroma. Recently, Zeisberg *et al.*¹⁶ observed frequent EndoMT in B16F10 melanoma and the Rip-Tag2 spontaneous pancreatic carcinoma models in transgenic mice. Transition was associated to co-expression of S100A4/ α -SMA and PECAM-1 by cancer-associated fibroblasts and perivascular cells.

In this study we investigate the potential contribution of endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) as a source of a specific myofibroblastic population characterized by α -SMA expression in epithelioid, mixed and spindle histological types of canine skin melanomas. We provide evidence that EndoMT might contribute in a lesser extent to cancer-associated myofibroblasts in these melanoma histotypes. We demonstrated co-expression of α -SMA and vW factor within cytoplasm of rare peritumoral and intratumoral rounded to spindle shaped stromal cells. Despite this, it is important to evaluate co-localization of other fibroblast/myofibroblasts and endothelial markers since alpha smooth muscle actin (α -SMA) is the most common, and not exclusive, molecular marker used to identify differentiated myofibroblasts in tumoral stroma⁸. Several other markers commonly used to verify endothelial-to-mesenchymal transition include VE-cadherin, PECAM-1, Tie-1, Tie-2 VEGFR-1, VEGFR-2, vimentin, type I and III collagen, fibronectin, vitronectin, paladin 4Ig, podoplanin, type I procollagen, zona-occludence-1, calponin, N-cadherin, fibronectin and vitronectin^{1,3,6,12,17}. Despite the fact that myofibroblasts are large spindle-shaped cells defined by indented nuclei, stress fibers and well developed fibronexus¹⁷, the

immunoexpression pattern defined by the fusion of green (vW factor) and red (α -SMA) channels allow us to classify such cells as cancer-associated myofibroblasts. In addition, vW and α -SMA antibodies are highly specific for endothelial cells/megakaryocytes¹⁸ and smooth muscle cells/myofibroblasts¹⁹ respectively. Since we are studying the endothelial-myofibroblast transition the use of only basic cell morphology to distinguish cellular types may influence final findings since endothelial cells can take on a plump spindle shape³. Although we have found evidence of endothelial-myofibroblast transition in only one melanoma sample, we believe that an increase in total number of samples for evaluation will also increase the chances to detect EndoMT.

The S100A4 protein has been related to cancer cell motility, invasiveness, apoptosis, metastasis and tumor angiogenesis^{9,11}. Also, it is highly correlated to an unfavourable prognosis and decreased patient survival⁹. We could find a significant difference in S100A4 expression among melanoma histotypes with spindle cell exhibiting higher level of expression compared to epithelioid and mixed types. Previous studies have reported different levels of S100A4 expression in neoplastic cells from human skin melanomas^{20,21,22,23}. Among conventional, spindle and desmoplastic cell types, the last ones showed a high relative percentual of positive cases²⁴. Using a panel of cell lines, neither melanocytes nor melanoma cells expressed significant levels of S100A4 in western blot analysis²⁵. The mRNA expression levels of S100A4 in biopsy samples from patients with metastatic melanomas varied greatly among them²⁶. S100A4 upregulation in tumor microenvironment are not restricted to stromal fibroblasts, being present in melanoma cells, macrophages and endothelial cells²⁷. These data all together suggest that S100A4 immunohistochemical and

mRNA expression in skin melanomas could be overestimated. The significance of S100A4 in cancer progression is well established, but further studies are needed to clarify its role in cutaneous melanomas.

The Clark's level of invasion is a stronger predictor of prognosis for ≤ 1 mm melanomas in human medicine²⁸. In a study comprising 98 skin melanomas distributed between Clark level interval 2 to 5, author's didn't find significant statistical correlation between S100A4 expression and level of invasion²³. A possible explanation to the lack of positive correlation among Clark's level and S100A4 expression might be related to the very close levels of invasion related to melanoma samples used in our study. Early growth phase melanomas commonly diagnosed in human medicine may be missed in dogs since lesions may not be biopsied until a vertical growth phase produces a more extensive lesion¹⁴. Lesions restricted to more superficial skin layers should be included in further studies since there are few comparable data regarding S100A4 expression and skin invasion.

Conclusions

The putative role of S100A4 as a prognostic factor in canine skin melanomas need further studies to better clarify the prognostic significance of this protein in cancer progression. Finally, additional studies are required to elucidate the relationship between CAF and endothelial-to-fibroblastic transition in skin melanomas.

Keywords: melanoma, endothelial-to-mesenchymal, transition, fibroblasts, CAF, myofibroblasts, dog, canine, skin.

Methods

Tissue specimens

The canine accessions considered in this study were retrospectively selected from surgical cases originally examined by different pathologists. Pathological database from Service of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil and Werner & Werner Laboratory of Veterinary Pathology, Curitiba, Paraná, Brazil from 2003 to 2011 were searched for histopathological diagnosis of melanocytic lesions of canine skin. New tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and reviewed by two pathologists (FG and NSR). Forth-eight cases of skin melanomas were selected.

Histopathological analysis

Four micrometers sections were obtained from each paraffin block, stained with H&E and classified accordingly to official WHO Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals²⁹.

Melanomas were classified in compound, dermal or junctional depending on the affected skin layers; and in epithelioid, spindle, round, mixed, dendritic, clear cell or signet-ring types depending on cell features. Neoplastic cells should have a minimal quantity of melanin pigment, subjectively assessed, to be considered melanocytic in origin. All non-pigmented samples were placed in a tissue microarray and submitted to immunohistochemistry (table 2). Additional features (e.g. “pagetoid” pattern) were also recorded when present. Nuclear atypia, mitotic index, degree of pigmentation, presence of ulceration, and level of invasion were considered the main morphological features in predicting

malignancy³⁰. Level of invasion was defined accordingly to Clark's level in: level I (intraepidermal growth of tumor cells with intact basement membrane), level II (invasion of the papillary dermis), level III (involvement of the junction between the papillary and reticular dermis), level IV (invasion of reticular dermis) and level V (invasion into the subcutaneous fat). Despite large majority of canine melanomas are primarily dermal in location and Clark's system are not used in veterinary medicine we choose to adopt classification scheme to more objectively classify level of invasion.

Tissue microarray construction

All non-pigmented melanoma samples were assembled in a tissue microarray in order to confirm melanocytic origin of neoplastic cells using a specific antibody panel (table 2). Briefly, one millimeter cylindrical core from formalin-fixed, paraffin embedded non-pigmented melanoma samples (N=10) were obtained manually from one representative area of each tumor and transferred to a recipient paraffin block. Tissue microarray was constructed using a Manual Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments, Estigen®). In addition, five normal pigmented skin samples were included in tissue microarray as positive controls for cytokeratin AE1/AE3, Melan A and vimentin. A benign peripheral nerve sheath tumor was used as positive control for S100 protein.

Immunohistochemistry

Tissue preparation

Four-micro-thick formalin-fixed, paraffin embedded sections from TMA and donor blocks were cut and mounted on positively charged slides (Amitel®). Tissue

sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in graded ethanol to water. Following deparaffinization, adherent tissue sections were immersed in an epitope retrieval solution (citrate buffer pH 6.0), heated to 125°C for 30 seconds followed by 90°C for 30 seconds in a pressure chamber (Pascal[®], Dako Cytomation), cooled to room temperature for 20 minutes and submitted to a water bath for 5 minutes. Slides destined to immunofluorescence were incubated with 5% milk solution for 30 minutes followed by a water bath for 5 minutes in order to reduce background staining. Further, tissue sections were incubated with specific primary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber.

Immunophenotyping of tumors

Immunohistochemical staining to determine melanocytic origin of cutaneous melanomas was performed manually. Tissue microarray sections were incubated with primary antibodies Melan A, pan-cytokeratin AE1/AE3, vimentin and S100 (table 2). Detection of primary antibody binding was performed utilizing polymer link detection system (Envision G2 System/AP[®]) following fabricant recommendations. Immunohistochemical reaction was visualized incubating samples with Permanent Red chromogen for 10 minutes. All sections were counterstained with Harris hematoxylin for 10 minutes followed by a water bath for 5 minutes and mounted with a permanent mounting media (Permount Fischer[®]). Negative controls were performed by substituting the primary antibody with antibody diluent (Novocastra[®]).

Immunophenotyping of cancer-associated fibroblasts

Immunophenotyping of cancer associated fibroblasts (CAF) in cutaneous melanomas was performed manually. Tissue sections were incubated with a S100A4 primary antibody (table 3) overnight at 4°C in a humidified chamber followed by incubation with secondary antibody (Alexa Fluor 488) (table 4) for 1 hour at room temperature. Nuclear counterstaining was performed with ProLong Gold Antifade with DAPI® (Invitrogen®) mounting media. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with antibody diluent (Novocastra®). Samples of normal skin were used as positive controls.

Intratumoral microvessel density (MVD) assessment

Immunohistochemical staining to determine MVD in cutaneous melanomas was performed manually. Tissue sections were incubated with the primary antibody anti-Von Willebrand Factor (table 3). Detection of primary antibody binding was performed utilizing secondary antibody Alexa Fluor 488® (table 4). All sections were counterstained and mounted with ProLong Gold Antifade with DAPI® reagent. Negative controls were performed by substituting the primary antibody with antibody diluent (Novocastra®). A normal skin sample was used as a positive control.

Intratumoral microvessel density was assessed by microscopic analysis for areas of the tumors that contained a high quality and distinct microvessel immunofluorescent staining pattern. The measurement was based on Weidner's method with minor modifications³¹. Briefly, areas of highest neovascularization were found by scanning all tumor sections at 100x total magnification and selecting those areas of melanomas with the greatest density

of distinct vWF-staining microvessels. After the areas of highest neovascularization were identified, individual microvessel counts were made on four fields, 200x each (individual area = $0.3059606142 \text{ mm}^2$; total area = $1.2238424568 \text{ mm}^2$) (Carl Zeiss, Lab A1 AXIO microscope). A countable microvessel was defined as any highlighted endothelial cell or endothelial cell cluster presenting a finely granular and green cytoplasmatic staining and blue nuclei, regardless of being part of an adjacent vessel, diameter, presents a lumen or red cells. Vessels inside ulcerated, necrotic or hemorrhagic areas were not counted. All vessels containing abundant red cells and well defined morphology were also considered since erythrocyte auto-fluorescence can omit endothelial immunostaining. Vessels within a distance from a 200x field area from ulcerated surfaces were not counted. All photomicrographs were obtained with the software AxioVs40 version 4.8.2.0 and analyzed in the digital image processing program Image J[®] (freeware).

Immunofluorescence for endothelial-fibroblast transition

Aiming to determine the potential role of endothelial-to-mesenchymal transition on cancer associated fibroblasts (CAF) a double parallel immunohistochemistry method using α -SMA and Von Willebrand antibodies (table 3) was performed. Tissue sections were incubated with a mix of primary antibodies overnight at 4°C in a humidified chamber followed by incubation with a mix of secondary antibodies (Alexa Fluor 488 and 594) secondary antibodies (table 4) for 1 hour at room temperature. Nuclear counterstaining was performed with ProLong Gold Antifade with DAPI[®] (Invitrogen[®]) mounting media. Negative controls were

performed by substituting the primary antibody with antibody diluent (Novocastra[®]). Samples of normal skin were used as positive controls.

Quantitative analysis of immunofluorescent images

The S100A4 expression in stroma was quantified as the relative percentage of the positive staining area to the selected whole stroma area. An average value of five random high power fields (400x) were selected for S100A4 expression. Image J[®] freeware was used to analyze images with K-means color clustering method accordingly to previous studies³². K-means clustering performs pixel-based segmentation of multi-band images. On Image J menu it was selected Plugins>Segmentation>K-means clustering. On K-means configuration menu it was selected a 0.00010 cluster center tolerance and a randomization seed of 48. Histograms were obtained in 8-bit images. The number of cluster varied accordingly to individual need of each photomicrograph (minimal=6; maximum=18).

Statistical analysis

All data were submitted to Shapiro-Wilk normality test. The comparison of S100A4 expression and MDV among histotypes was evaluated nonparametrically using Kruskal-Wallis test followed by Student-Newman-Keul's *post-hoc* test when necessary. Jonckheere-Terpstra's test was used to compare S100A4 expression and Clark's level. The correlation between MVD and S100A4 expression was assessed by Spearman's rank linear correlation coefficient. A value of $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed in IBM SPSS 20 software.

Author's contributions

FG designed the study, performed immunohistochemical assays, participated in image analysis, contributed to statistical analysis, interpretation of results and prepared the manuscript. RMR contributed to prepare the manuscript. NSR participated in the design of the study, immunohistochemical interpretation and contributed to prepare the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank Werner & Werner Laboratory of Veterinary Pathology for providing histological samples; Mr. Carlos Ferreira do Nascimento (Cancer Hospital, São Paulo, Brazil) for technical assistance in the construction of tissue microarrays and Professor Hélio Amante Miot for image and statistical analysis. This study was supported by grants number 2010/14317-8 and 2011/01610-1 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Author Details

Fabrizio Grandi, D.V.M. Veterinary Pathologist. Laboratory of Investigative and Comparative Pathology, Service of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ. Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

References

1. Liu M, Xu J, Deng H. Tangled fibroblasts in tumor-stroma interactions. *Int J Cancer*. 2011; 129:1795-1805.
2. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971 27:549-50.
3. Gonda, TA, Varro A, Wang TC; Tycko, B. Molecular biology of cancer associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 21(1): 2-10.
4. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2010 Feb;21(1):33-9.
5. Rasanen K, Vaheri A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*. 2010 Oct 15;316(17):2713-22.
6. Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther*. 2006 Dec;5(12):1640-6.
7. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res*. 2011;1(4):482-97.
8. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007 Jun;170(6):1807-16.
9. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):677-80.

10. Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4 (mts1) gene. *Cancer Res.* 2005 May 1;65(9): 3772-80.
11. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumor progression and metastasis. *Br J Cancer* 2005 Jun 6; 92(11):1955-58.
12. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer.* 2008 Nov 4;99(9):1375-9.
13. Li J, Bertram JF. Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis. *Nephrology (Carlton).* 2010 Aug;15(5):507-12.
14. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2005.
15. Smith SH, Goldschmidt MH, Macmanus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol.* 2002 39(6):651-78.
16. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10123-8.
17. De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer.* 2008 Nov 15;123(10):2229-38.
18. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.

19. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillesen D, Gabbiani G.
A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe
for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 2):2787-
96.
20. Boni R, Burg G, Doguoglu A, Ilg EC, Schafer BW, Muller B, et al.
Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in
normal human skin and melanocytic lesions. *Br J Dermatol.* 1997
Jul;137(1):39-43.
21. Boni R, Heizmann CW, Doguoglu A, Ilg EC, Schafer BW, Dummer R, et
al. Ca(2+)-binding proteins S100A6 and S100B in primary cutaneous
melanoma. *J Cutan Pathol.* 1997 Feb;24(2):76-80.
22. Andersen K, Nesland JM, Holm R, Florenes VA, Fodstad O,
Maeldandsmo GM. Expression of S100A4 combined with reduced E-
cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma.
Mod Pathol. 2004 Aug;17(8):990-7.
23. Bolander A, Agnarsdóttir M, Wagenius G, Strömberg S, Pontén F,
Ekman S, Brattström D, Larsson A, Einarsson R, Ullenhag G, Hesselius
P, Bergqvist M. Serological and immunohistochemical analysis of S100
and new derivatives as markers for prognosis in patients with malignant
melanoma. *Melanoma Res.* 2008;18(6): 412-19.
24. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Differential expression of S100
protein subtypes in malignant melanoma, and benign and malignant
peripheral nerve sheath tumors. *J Cutan Pathol.* 2008 Nov;35(11):1014-
9.

25. Petersson S, Shubbar E, Enerback L, Enerback C. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 2009 Aug;19(4):215-25.
26. Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O. Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer.* 1997 Aug 22;74(4):464-9.
27. Hofmeister-Mueller V, Vetter-Kauczok CS, Ullrich R, Meder K, Lukanidin E, Broecker EB, et al. Immunogenicity of HLA-A1-restricted peptides derived from S100A4 (metastasin 1) in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Aug;58(8):1265-73.
28. Petro A, Schwartz J, Johnson T. Current melanoma staging. *Clin Dermatol.* 2004 May-Jun;22(3):223-7.
29. Goldschmidt M, Dunstan R, Stannard A. *Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals.* Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, 1998.
30. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ, Ho HY, Bergin IL, Kiupel M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol.* 2008 48(1):54-72.
31. Weidner, N. Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol.* 1995, 147:9-19.
32. Miot HA, Brianezi G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *An Bras Dermatol.* 2010 Jun;85(3):361-4.

Tables

Table 1. Association between S100A4 expression, MVD and histotypes represented as median and interquartile range.

Variables	Epithelioid	Mixed	Spindle	<i>p</i> value
S100A4 expression (%)^a	4.28% (3.16%)	3,43% (1,87%)	6,34% (6.04%)	<0.01
MVD count^{a,b}	33/128 (43.0)	33/85(54.0)	20/124 (54.5)	<0.16

^aKruskal-Wallis test

^bExpressed as minimum/maximum number of vessels per 1.22 mm² (median)

Table 2 - Primary antibodies used in tumor phenotyping.

Antibody (clone)	Dilution	Source (code)	Clonality/host/specificity
Cytokeratin (AE1/AE3)	1:100	Dako Cytomation [®] (M3515)	Monoclonal/mouse/anti-human
Vimentin (V9)	1:2000	Dako Cytomation [®] (M0725)	Monoclonal/mouse/anti-human
S100	1:100	Dako Cytomation [®] (Z0311)	Polyclonal/rabbit/several
Melan A (A103)	1:50	Dako Cytomation [®] (M7196)	Monoclonal/mouse/human

Table 3 – Primary antibodies used in CAF immunophenotyping and MVD assessment.

Antibody (clone)	Dilution	Source (code)	Clonality/host/specificity
α -SMA (CGA7)	1:2000	Santa Cruz Biotechnology [®] (sc53015)	monoclonal/mouse/several
vWF	1:2000	Dako [®] (A0082)	Polyclonal/rabbit/several
S100A4	1:1200	Abcam [®] (code ab27957)	Polyclonal/rabbit/several

Table 4 – Secondary fluorescent antibodies and DAPI used in CAF immunophenotyping and MVD assessment.

Antibody	Dilution	Source (code)	Color/host/specificity
Alexa Fluor 488 [®]	1:1000	Invitrogen [®] (A11008)	green/goat/rabbit
Alexa Fluor 594 [®]	1:1000	Invitrogen [®] (A11005)	red/goat/mouse
ProLong Gold Antifade with DAPI [®]	Pure	Invitrogen [®]	Blue/nuclei

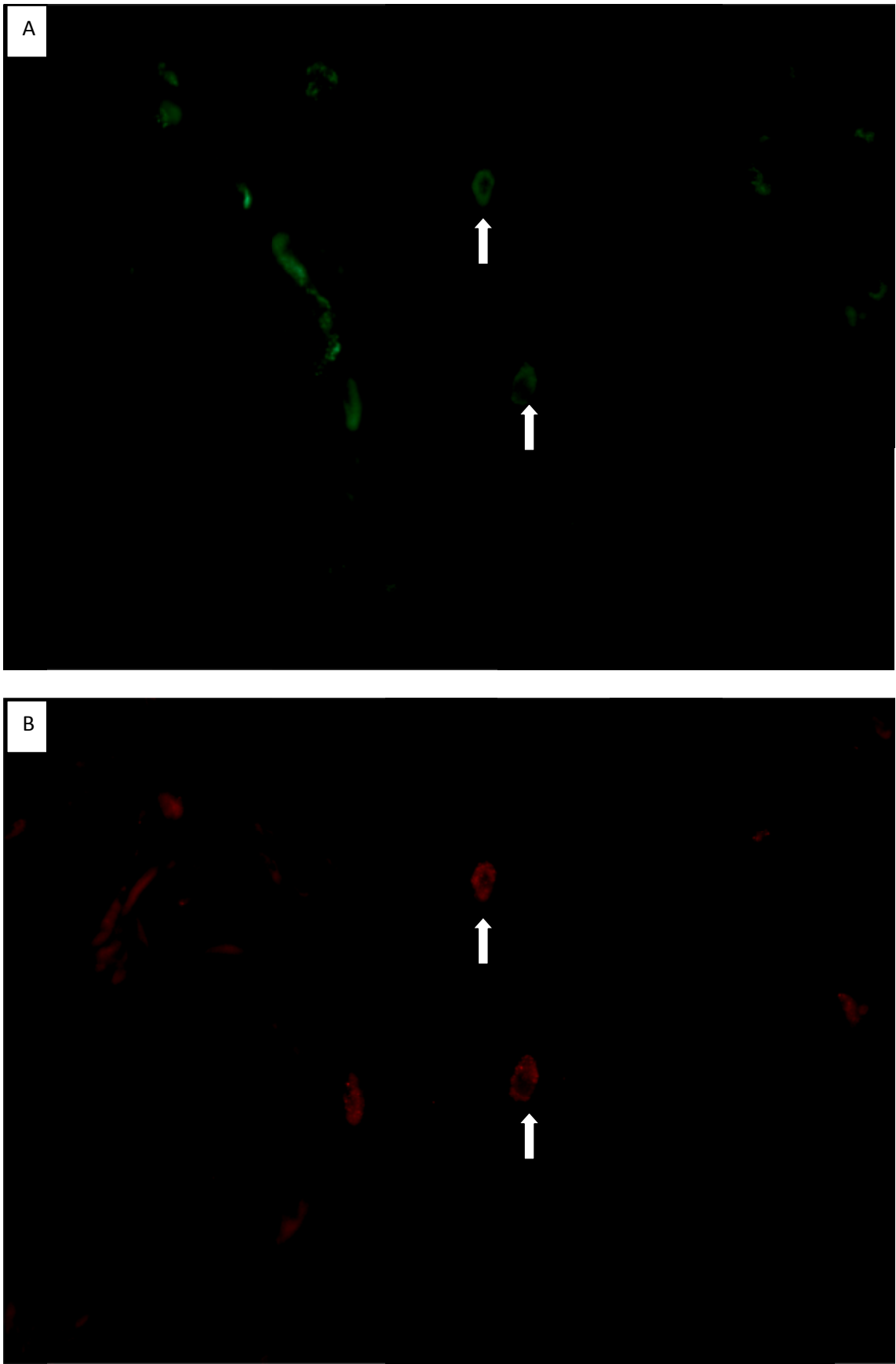
Figures

Figure 1. S100A4/ α -SMA co-expression in stromal cells. Single color panels displaying staining for α -SMA (A), Von Willebrand factor (B) and DAPI (C). (D) Merged panels displaying co-expression of S100A4/ α -SMA in yellow. DAPI was used for labeling nuclei (blue).

Figure 2. S100A4 expression in tumor stroma. Positive cytoplasmatic staining (green) of stromal fibroblasts. DAPI was used for labeling nuclei (blue).

Figure 3. Vessels positive for Von Willebrand factor. A granular and diffuse green cytoplasmatic immunolabeling of endothelial cells can be seen in this vascular “hotspot”. DAPI was used for labeling of nuclei (blue).

Figure 1. Single and merged panels



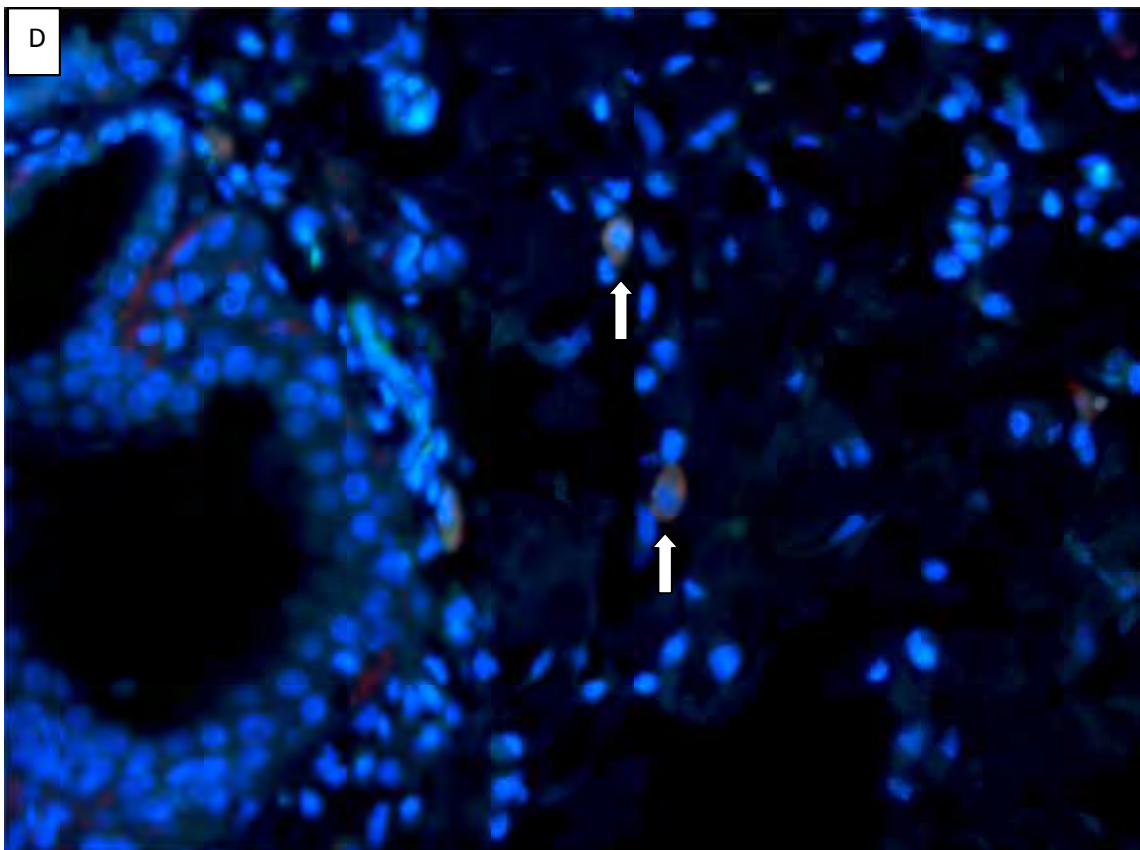
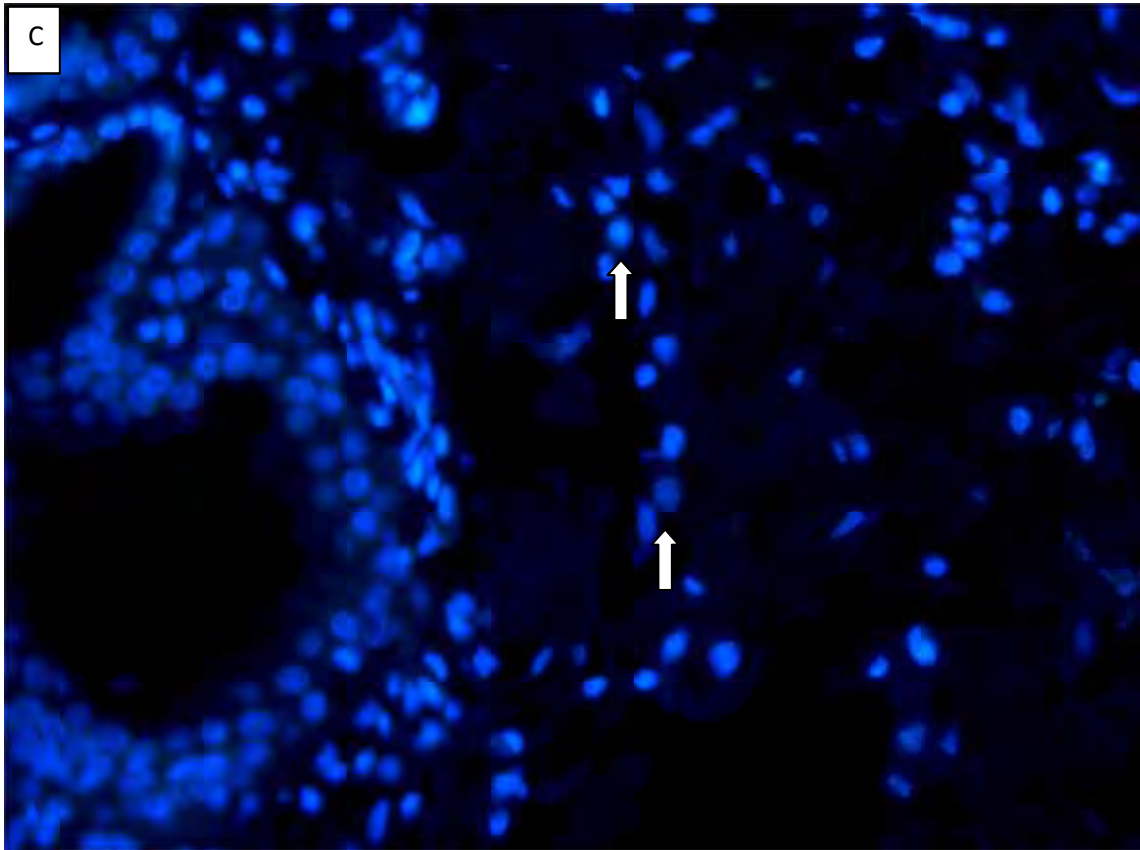


Figure 2.

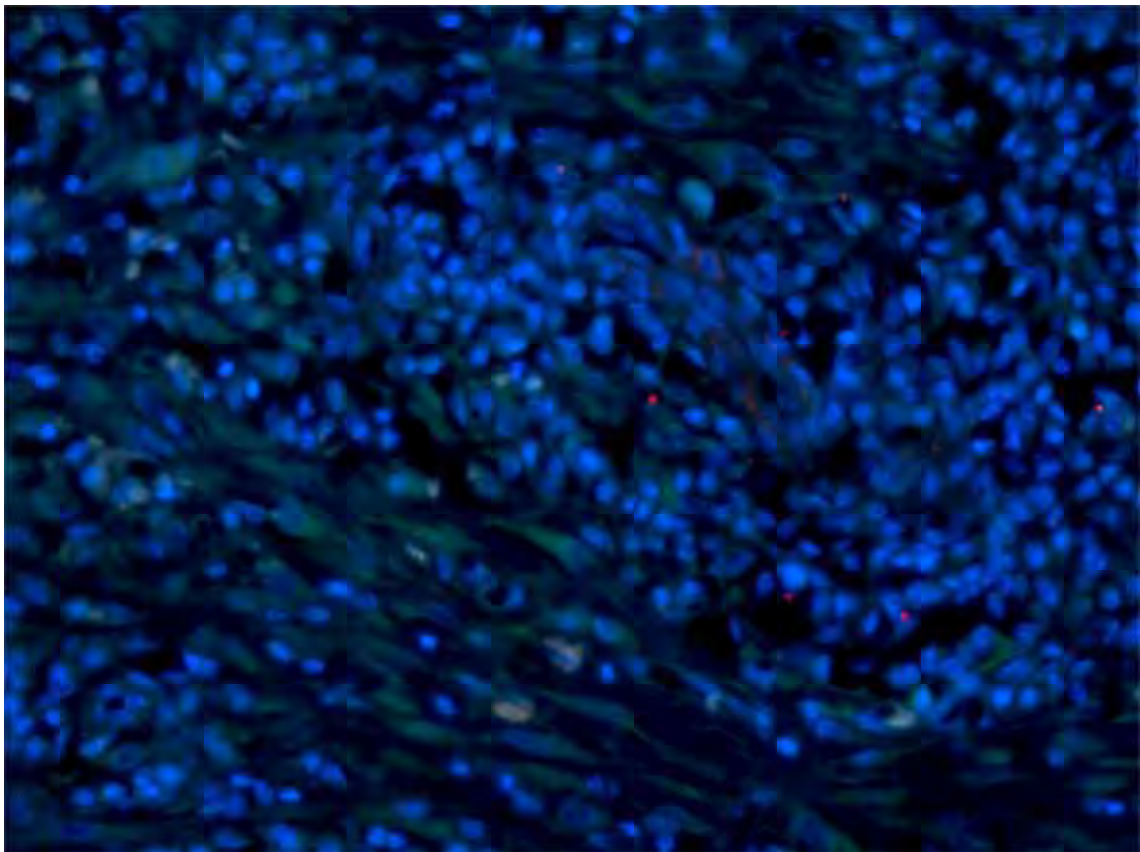
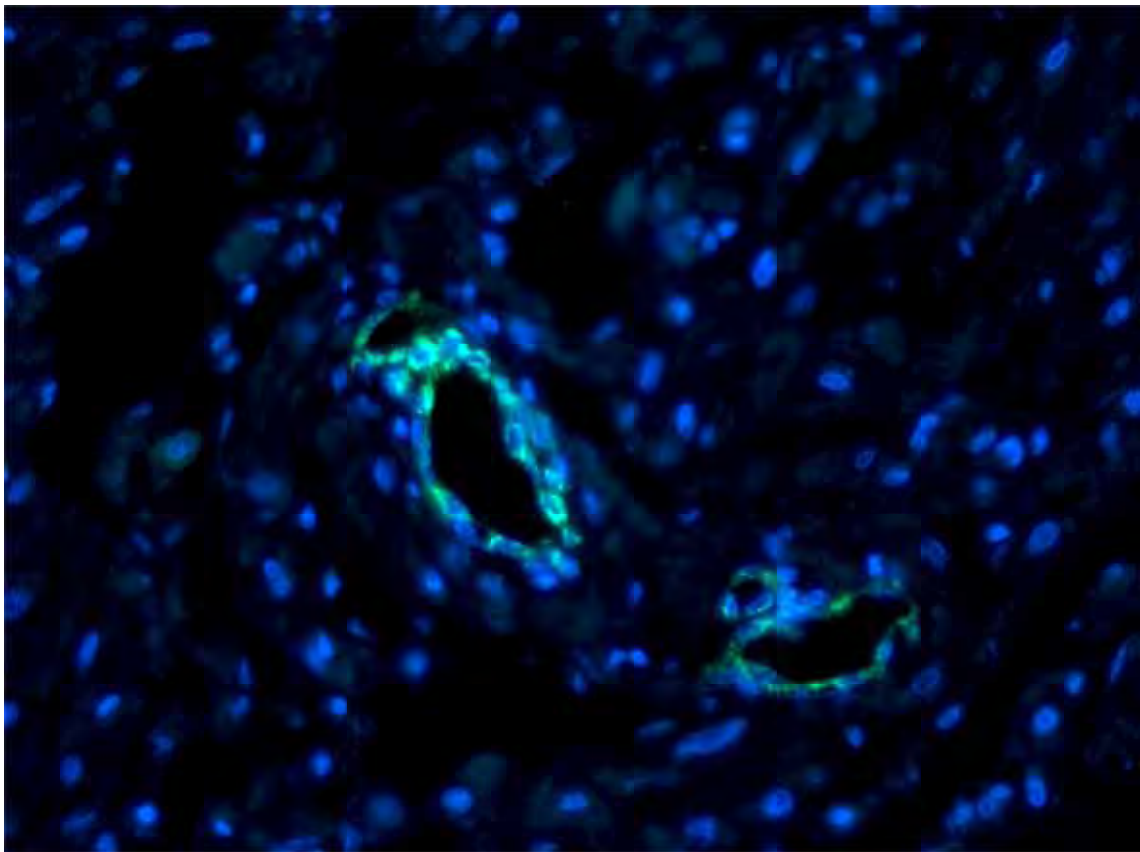


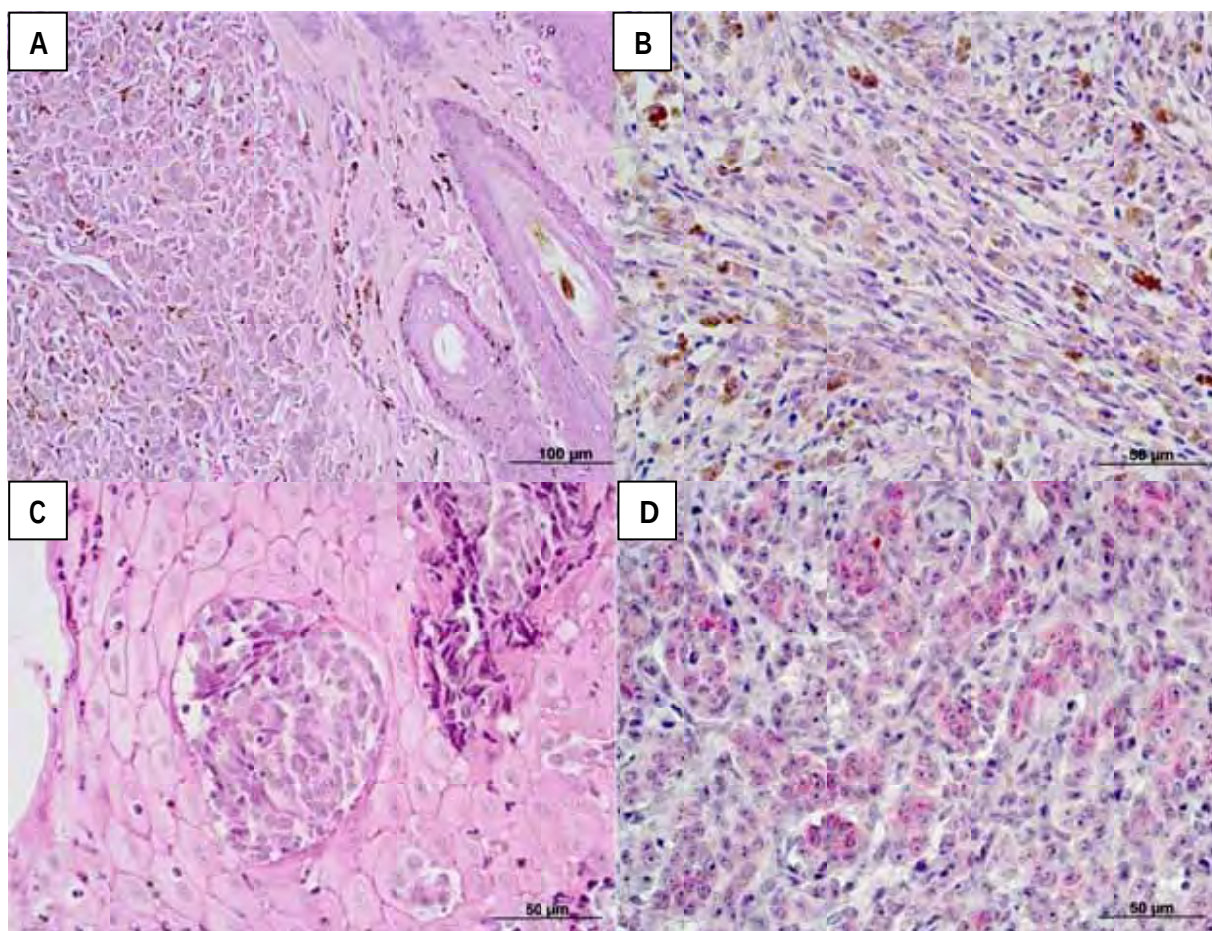
Figure 3.



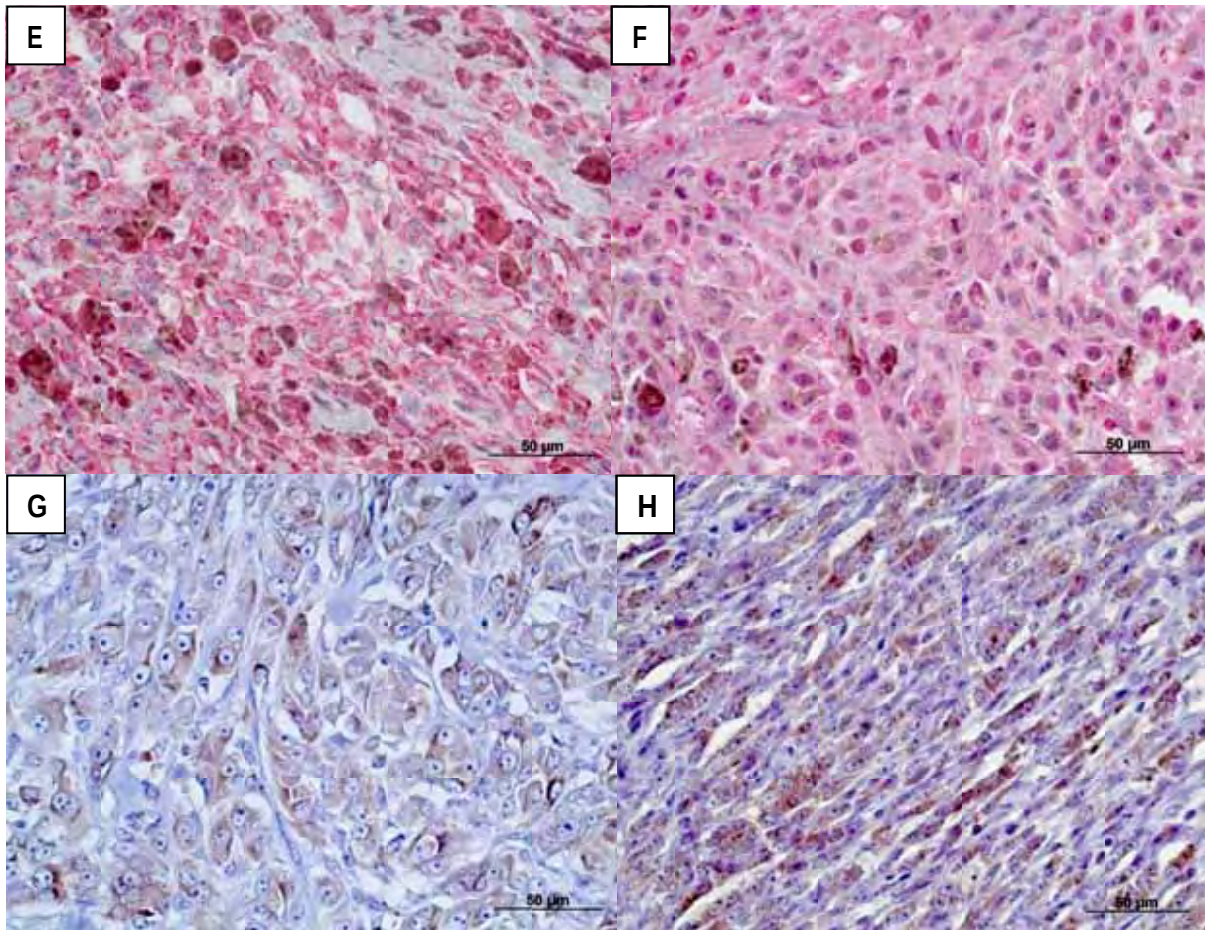
CONCLUSÃO FINAL

O papel da proteína S100A4 nos melanomas cutâneos caninos necessita de maiores estudos para a elucidação do seu significado prognóstico na progressão neoplásica. A transição endotelial mesenquimal pode contribuir para a população de fibroblastos associados ao câncer. Entretanto, a utilização de outros marcadores e o aumento no número de amostras é imprescindível para a definição de futuras conclusões a respeito de tal fato.

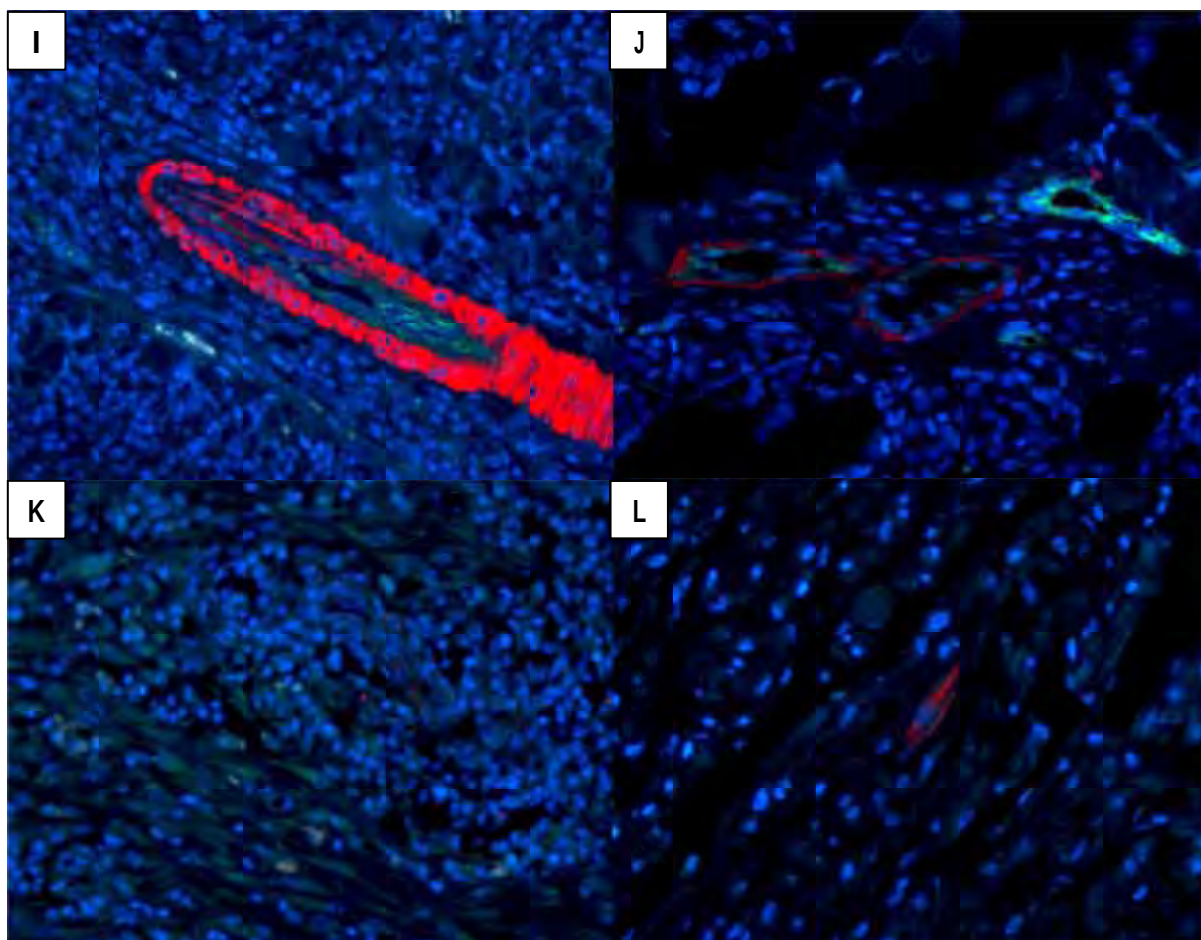
APÊNDICE I – ILUSTRAÇÕES



usiforme
granular
nentado.
anular e



mentina
400x; F)
exibindo
400x; G)
ositivos.



exibindo
/amente,
400x L)

APÊNDICE II – ANÁLISE ESTATÍSTICA

HISTOTIPO E EXPRESSÃO DE S100A4 ESTROMAL

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
S100A4	.140	47	.022	.868	47	.000

a. Lilliefors Significance Correction

stromal



0,96;
p=0,19);

DENSIDADE MICROVASCULAR E EXPRESSÃO DE S100A4 ESTROMAL

Teste do coeficiente de correlação linear de Spearman (r_s)

			S100A4	MVD
Rô de Spearman	S100A4	Correlações de coeficiente	1.000	-.024
		Sig. (2 extremidades)	.	.873
		N	47	46
	MVD	Correlações de coeficiente	-.024	1.000
		Sig. (2 extremidades)	.873	.
		N	46	47

NÍVEL DE CLARK E EXPRESSÃO DE S100A4 ESTROMAL

Tests of Normality

	Clark's level	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
S100A4	1,00	.146	16	.200 [*]	.864	16	.022
	2,00	.209	14	.100	.900	14	.114
	3,00	.149	17	.200 [*]	.919	17	.140

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

stromal

normal.

DENSIDADE MICROVASCULAR E HISTOTIPOS

