



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica e Translacional**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VERSICAN E SEU PROTEÓLITO NOS  
SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA**

**MARÍLIA SAMPAIO LEMOS COSTA**

**Salvador - Bahia**

**2022**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MUNIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica e Translacional**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VERSICAN E SEU PROTEÓLITO NOS  
SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA**

**MARÍLIA SAMPAIO LEMOS COSTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica e Translacional para obtenção do título de Mestra.

Orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

Coorientadora: Dra. Juliana Ribeiro de Freitas

**Salvador - Bahia**

**2022**

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

**C837c** Costa, Marília Sampaio Lemos

Caracterização da expressão de versican e seu proteólito nos subtipos moleculares de câncer de mama / Marília Sampaio Lemos Costa. \_ Salvador, 2022.

94 f.: il.: 30 cm.

Orientadora: Dra. Karine Araújo Damasceno

Coorientadora: Dra. Juliana Ribeiro de Freitas

Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica e Translacional) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

1. Versican. 2. Versikina. 3. Matriz extracelular. 4. Câncer de mama. I. Título.

CDU 618.19-006

**“CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VERSICAN E SEU PROTEÓLITO  
NOS SUBTIPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA”.**

**MARÍLIA SAMPAIO LEMOS COSTA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 21 de novembro de 2022.

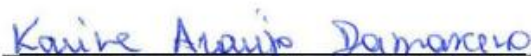
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Daniel Abensur Athanázio  
Professor Adjunto  
UFBA



Dra. Maria Lourdes Farre Vallve  
Pesquisadora em saúde pública  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Karine Araújo Damasceno  
Pesquisadora em saúde pública  
IGM/FIOCRUZ

## **NTE DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Clínica AMO – Assistência Multidisciplinar em Oncologia.

À minha mãe, que me ensinou que a educação é o maior instrumento de transformação.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Maria José e Geraldo e minha irmã Mariana, por sempre acreditarem e apoiarem meus sonhos.

A meu esposo, Luciano, que foi meu apoio e sustentação durante o período.

Aos amigos, por estarem à disposição a escutar, ajudar e me animar nos momentos de insegurança.

À Dra. Karine Damasceno, orientadora e Dra. Juliana Freitas, coorientadora, que foram as guias por todo percurso para me tornar mestra.

À Martha Machado, pelo apoio técnico na realização das imuno-histoquímicas.

À Lorena Magalhães, pela parceria que foi fundamental para execução desse trabalho.

Aos colegas do GOC (Grupo de Oncologia Comparada), em especial a Bruno Almeida, que me auxiliaram na realização da imuno-histoquímica e nas análises.

À Dr. Cláudio Figueira, que com leveza e paciência me fez aprender um novo olhar através das lentes dos microscópios.

Ao LAPEX (Laboratório de Patologia Experimental) e IGM (Instituto Gonçalo Muniz), por fornecer toda estrutura e meios para chegar nessa conquista.

Ao IMAGEPAT, que acreditou no projeto e tornou-se parceira na execução.

À Clínica AMO, que foi incentivadora para o ingresso nesse desafio.

Aos pacientes, que acreditaram na ciência e na pesquisa e tornaram esse projeto possível. Eles são a fonte de estímulo para meu aprimoramento médico e exemplos para meu crescimento humano.

“It ain’t what you don’t know that gets you into trouble. It’s what you know for sure that just ain’t so.”

**(Samuel Langhorne Clemens)**



COSTA, Marília Sampaio Lemos. **Caracterização da expressão de versican e seu proteólito nos subtipos moleculares de câncer de mama**. 2022. 94 f. il. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica e Translacional) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A desregulação da matriz extracelular tem sido alvo de estudos para identificação de novos biomarcadores que estejam associados na carcinogênese. Nesse contexto, o versican (VCAN) tem sido estudado e associado com aumento de recidiva em pacientes com câncer de mama. No entanto, a literatura é escassa e não se estabeleceu correlação entre sua expressão e fatores prognósticos conhecidos. Em modelos experimentais observou-se que o produto da proteólise de VCAN, denominada versikina (VKINA), está correlacionada a infiltração tumoral de linfócito TCD8+. No câncer de mama, não há dados sobre sua expressão e correlação com infiltrado linfocitário (TILs), que é fator prognóstico e preditivo conhecido. O presente estudo investigou a expressão deste proteoglicano e seu proteólito nos subtipos moleculares de carcinomas de mama e buscou estabelecer correlação fatores clínico-patológicos e desfechos oncológicos. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão e correlação de VCAN e VKINA com subtipos moleculares, com fatores clínico patológicos e desfechos de sobrevida em câncer de mama. **MÉTODOS:** Estudo de coorte retrospectiva, composto por pacientes diagnosticadas com câncer de mama invasivo de tipo não especial, submetidas a tratamento cirúrgico primário, acompanhadas em clínica privada, no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2020. Foram coletados dados clínicos, patológicos e de tratamento. Foi realizada avaliação anatomopatológica e imuno-histoquímica (versican, versikina, CD4 e CD8) dos casos selecionados, sob técnica específica. Os valores de escore de VCAN e VKINA foram divididos em 3 categorias (baixa, intermediária e alta) para verificar seu comportamento nos subtipos moleculares. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FIOCRUZ/ CPqGM. A voluntariedade na participação se fez mediante a assinatura do TCLE. **RESULTADOS:** Foram elegíveis 72 pacientes para participar do estudo. A idade média foi 59 anos. O estadiamento patológico I foi o mais frequente (48,6%). O subtipo luminal foi o mais comum (68,1%), seguida do HER2 (19,4%) e triplo negativo (12,5%). A expressão de VCAN esteve aumentada nos subgrupos tumorais quando comparados ao grupo controle ( $p = 0,010$ ). Os subtipos luminais e HER-2 apresentaram diferenças estatísticas significativas com relação ao grupo controle ( $p < 0,001$  e  $p = 0,020$ , respectivamente). A avaliação percentual do VKINA estromal foi maior no grupo controle, sendo que este diferiu dos grupos HER2 positivo ( $p = 0,006$ ) e luminal ( $p = 0,002$ ). Maior intensidade de VKINA foi verificada nos subgrupos tumorais quando comparada ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Verificou-se diferença com significância estatística na expressão de CD8+ entre os escores categorizados de VKINA ( $p = 0,040$ ). A expressão de CD4 aumentou com o aumento do escore de VKINA, mas essa diferença não apresentou significância estatística ( $p = 0,439$ ). Não foi verificada associação entre escores de VCAN e VKINA e sobrevida global e sobrevida livre de recorrência. **CONCLUSÃO:** VCAN encontra-se superexpresso nas amostras de câncer de mama avaliadas comparadas as mamas normais, no entanto não foram observadas diferenças entre os subtipos moleculares. Além disso, os casos que apresentaram maior expressão de VKINA foram correlacionados a maior infiltrado de células CD8+, sugerindo um possível papel imunomodulador deste proteólito.

**Palavras-chave:** Versican. Versikina. Matriz extracelular. Câncer de mama.

COSTA, Marília Sampaio Lemos. **Characterization of the expression of versican and its proteolyte in the molecular subtypes of breast cancer**. 2022. 94 f. il. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica e Translacional) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The deregulation of the extracellular matrix has been the target of studies to identify new biomarkers that are associated with carcinogenesis. In this context, Versican (VCAN) has been studied and associated with increased recurrence in breast cancer patients. However, there is not enough literature about it and no correlation has been established between its manifestation and known prognostic factors. Versikine (VKINA) is a proteolytic degradation of Versican, and it correlates with TCD8+ lymphocyte tumor infiltration. In breast cancer, there is no data on its manifestation and correlation with lymphocyte infiltration (TILs), which is a known prognostic and predictive factor. This study investigated the expression of VCAN and VKINA in molecular subtypes of breast carcinomas and it sought to establish a correlation between clinic pathological factors and oncological outcomes. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression and correlation of VCAN and VKINA with molecular subtypes, with clinical and pathological factors and survival outcomes in breast cancer. **METHODS:** Retrospective cohort composed of patients diagnosed with NST invasive breast cancer and undergoing primary surgical treatment, who were followed up in a private clinic from January 2010 to December 2020. Clinical, pathological and treatment data were collected. Anatomopathological and immunohistochemical evaluations (Versican, Versikine, CD4 and CD8+) of the selected cases were performed using a specific technique. The project was approved by the Ethics and Research Committee of FIOCRUZ/ CPqGM. Voluntary participation was obtained by signing the Informed Consent Form. **RESULTS:** 72 patients were eligible to participate in the study. The average age was 59 years. Pathologic staging I was the most frequent one (48.6%). The luminal subtype was the most common one (68.1%), followed by HER2 (19.4%) and triple negative (12.5%). VCAN expression was increased in the tumor subgroups when compared to the control group ( $p = 0.010$ ). Luminal and HER-2 subgroups showed meaningful statistical differences with respect to the control group ( $p < 0.001$  and  $p = 0.020$  respectively). The percentage assessment of stromal VKINA was higher in the control group, which differed from the positive HER2 ( $p = 0.006$ ) and luminal ( $p = 0.002$ ) groups. Higher VKINA intensity was seen in the tumor subgroups when compared to the control group ( $p < 0.001$ ). There was a difference with statistical significance in CD8+ expression between the categorized VKINA scores ( $p = 0.040$ ). There was a difference with statistical meaning in CD8+ expression among the categorized VKINA scores ( $p = 0.040$ ). CD4 expression increased as VKINA score increased, but this difference was not statistically meaningful ( $p = 0.439$ ). There was no association between VCAN and VKINA scores and overall survival and recurrence-free survival. **CONCLUSION:** VCAN is overexpressed in breast cancer when compared to healthy breasts. However, no differences were observed between molecular subtypes and correlation with clinical and anatomopathological characteristics. Moreover, the cases that showed higher expression of VKINA were correlated to higher infiltration of CD8+ cells, suggesting a possible immunomodulatory role of this protease.

**Keywords:** Versican. Versikine. Extracelular matrix. Breast cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Influência da matriz extracelular nas características do câncer	24
<b>Figura 2</b>	Estrutura das isoformas de versican	25
<b>Figura 3</b>	Esquema da quebra do versican	27
<b>Figura 4</b>	Representação do meio inflamatório de versican V0/V1 e versikina e seus respectivos efeitos na imunidade do tumor	28
<b>Figura 5</b>	Disposição dos pacientes	43
<b>Figura 6</b>	Imunomarcção de versican no estroma mamário normal	50
<b>Figura 7</b>	Imunomarcção de versikina no estroma mamário normal	51
<b>Figura 8</b>	Imunomarcção de versican nas áreas de câncer de mama	52
<b>Figura 9</b>	Imunomarcção de versikina nas áreas de câncer de mama	53
<b>Figura 10</b>	Avaliação de CD4 e CD8+ conforme escore categorizado de TILs	59
<b>Figura 11</b>	Avaliação de CD4 e CD8+ conforme escore categorizado de versican	60
<b>Figura 12</b>	Avaliação de CD4 e CD8+ conforme escore categorizado de versikina	61
<b>Figura 13</b>	Avaliação da sobrevida global e sobrevida livre de recorrência conforme categoriais de versican e verskina	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Definição dos subtipos de câncer de mama	19
<b>Tabela 2</b>	Lista de anticorpos e as respectivas diluições adotadas	36
<b>Tabela 3</b>	Grau Histológico de Nottingham	39
<b>Tabela 4</b>	Características clínicas da população estudada	44
<b>Tabela 5</b>	Características anatomopatológicas da população estudada	45
<b>Tabela 6</b>	Características imuno-histoquímicas da população estudada	47
<b>Tabela 7</b>	Subtipos moleculares na população estudada	47
<b>Tabela 8</b>	Avaliação de TILS e da expressão de CD4 e CD8 na população estudada	48
<b>Tabela 9</b>	Avaliação de VCAN e VKINA no grupo controle e grupo de casos	49
<b>Tabela 10</b>	Comparação entre os subtipos moleculares e expressão de VCAN e VKIN	54
<b>Tabela 11</b>	Comparação entre os subtipos moleculares e as características clínicas e anatomopatológicas.	56
<b>Tabela 12</b>	Comparação da expressão de CD4 e CD8 entre os subtipos moleculares e grupo controle	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADAMTS</b>	A Desintegrina e Metaloproteinase com motivos de Trombospondina
<b>AMO</b>	Assistência Multidisciplinar em Oncologia
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committe</i>
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidérmico
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Osvaldo Cruz
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>HA</b>	Hialurônico
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>IGM</b>	Instituto Gonçalo Muniz
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>NK</b>	<i>Natural – killer</i>
<b>LPBC</b>	Câncer de mama com predomínio linfocitário
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento associado as plaquetas
<b>PCR</b>	Resposta patológica completa
<b>RE</b>	Receptor de estrogênio
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>TILs</b>	Infiltrado linfocitário associada ao tumor
<b>TIL WG</b>	<i>Internacional Immuno-oncology Biomarker Working Group</i>
<b>TLS</b>	Estruturas Linfoides Terciárias
<b>TME</b>	Microambiente tumoral
<b>TN</b>	Triplo negativo
<b>VCAN</b>	Versican
<b>VKINA</b>	Versikina

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
2.1	CÂNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA E SUBTIPOS MOLECULARES	18
2.2	FATORES PROGNÓSTICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA	21
2.3	MICROAMBIENTE TUMORAL E MATRIZ EXTRACELULAR	23
2.4	VERSICAN: CONCEITOS E PAPEL NA CARCINOGENESE DO CÂNCER DE MAMA	25
2.5	PROTEÓLISE DO VERSICAN	27
2.6	INFILTRADO LINFOCITÁRIO ASSOCIADO AO TUMOR	28
3	<b>JUSTIFICATIVA</b>	32
4	<b>OBJETIVO</b>	33
4.1	OBJETIVO GERAL	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5	<b>METODOLOGIA</b>	34
5.1	DESENHO E TIPO DE ESTUDO	34
5.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO E COLETA DE DADOS	34
5.3	SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE	35
5.4	CRITÉRIO DE INCLUSÃO	35
5.5	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	35
5.6	PROCESSAMENTO DA AMOSTRA	35
5.7	IMUNO-HISTOQUÍMICA	36
5.8	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CD8	36
5.9	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CD4	37
5.10	IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA VERSICAN E VERSIKINA	38
5.11	HISTOPATOLOGIA	38
5.12	GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA	39
5.13	AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO	40
5.14	QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 E CD8+	40
5.15	AVALIAÇÃO DE VERSICAN E VERSIKINA	40
5.16	DESFECHOS	41
5.17	ASPECTOS ÉTICOS	41
5.18	ANÁLISE ESTÁTISTICA	41

6	<b>RESULTADOS</b>	43
6.1	CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES	43
6.2	CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DA POPULAÇÃO AVALIADA	44
6.3	CARACTERÍSTICAS IMUNO-HISTOQUÍMICAS DA POPULAÇÃO AVALIADA	45
6.4	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO GRUPO CONTROLE	48
6.5	ANÁLISE DE VERSICAN, VERSIKINA E COMPARAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS-PATOLÓGICAS GERAIS	51
6.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA NOS SUBTIPOS MOLECULARES	53
6.7	COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICA	56
6.8	AVALIAÇÃO DE TILS NOS SUBTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA	58
6.9	COMPARAÇÃO DE TILS E EXPRESSÃO DE CD4 E CD8+	59
6.10	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE VERSICAN, VERSIKINA E PRESENÇA DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+	59
6.11	AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE RECORRÊNCIA CONFORME EXPRESSÃO CATEGORIZADA DO SCORE DE VERSICAN E VERSIKINA	61
7	<b>DISCUSSÃO</b>	63
8	<b>CONCLUSÃO</b>	67
	<b>REFERÊNCIAS</b>	68
	<b>ANEXOS</b>	77

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o câncer mais frequentemente diagnosticado entre as mulheres e uma das principais causas de morte em mulheres em todo mundo. A existência de heterogeneidade tumoral limita a terapia direcionada (JING et al, 2020).

Atualmente, diversas pesquisas estão em andamento para identificação e aprimoramento de biomarcadores no câncer de mama que possam contribuir para estratificação prognóstica e como alvo terapêutico. Nesse contexto, há um interesse crescente no estudo do microambiente tumoral (TME), reconhecido como um elemento crítico para o desenvolvimento e progressão tumoral (TAN et al., 2022; SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

A matriz extracelular tumoral (MEC) é um importante componente do microambiente e encontra-se desorganizada e desregulada no câncer de mama (NAJAFI; FARHOOD; MORTEZAEE, 2019). Formado por uma rede complexa de proteínas, a MEC era inicialmente considerada apenas uma estrutura estática, mas estudos sugerem que seja dinâmica, versátil e desempenhe um papel importante nos processos celulares como crescimento, proliferação e migração (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015).

O versican (VCAN) é um dos proteoglicanos que compõe a MEC e tem sido estudado na carcinogênese, nas etapas da proliferação, diferenciação, adesão celular, migração e apoptose (ASANO et al., 2017; DU et al., 2010). No câncer de mama, a deposição de VCAN está associada a tumores com alto grau histológico e parece ser um fator associado a recidiva de doença em pacientes com câncer de mama sem acometimento linfonodal (RICCIARDELLI et al, 2002; SUWIWAT et al., 2004). Sugere-se também que a interação do VCAN com os demais componentes da MEC esteja associada a neovascularização e multiplicação celular (YEE et al., 2007; DU et al., 2013). No entanto, é escassa na literatura a relação da deposição de VCAN com os fatores prognósticos e diferenças nos subtipos moleculares em pacientes com câncer de mama.

O VCAN está sujeito a proteólise por atividade de proteases, como as enzimas da família de desintegrinas e metaloproteinases com domínios trombospondinas (ADAMTS) (KENAGY; PLAAS; WIGHT, 2006). Estas enzimas têm participação chave no remodelamento da matriz e são responsáveis por gerar subprodutos de versican, denominados versikina (VKINA) (BINDER et al., 2017). Este proteólito tem sido associado ao remodelamento vascular e ao efeito imunomodulador da resposta imune em mieloma múltiplo e câncer colorretal (PAPADAS et al., 2020; ASANO et al., 2017). No mieloma múltiplo, a proteólise do VCAN induzida por macrófagos está associada a infiltração de células T CD8+, expressão de IL-6 e



IL-1b e diferenciação dos monócitos (HOPE et al., 2016). No câncer colorretal, a VKINA esteve associada a aumento do infiltrado de células T CD8+ e disfunção de células dendríticas que são críticas na atividade antitumoral de células T (HOPE et al., 2017).

No câncer de mama, é conhecido que a presença de infiltrado de linfócitos peritumoral (TILs) tem relevância em prognóstico e é preditor de resposta a tratamento no câncer de mama, em especial nos tumores triplo negativo e HER2 positivo (VINGIANI; VIALE; CURIGLIANO, 2020; MIYASHITA et al., 2015). O fenótipo do infiltrado inflamatório também impacta no desfecho clínico (TAVARES, 2018). Por exemplo, as células T citotóxicas CD8+ e T CD4 *helper* 1 (Th1) são essenciais para resposta imune ao tumor e apresentam correlação com melhores desfechos (TAVARES, 2018; SALGADO et al., 2015), enquanto T CD4 *helper* (Th2) inibem a função dos linfócitos T citotóxicos e a proliferação de linfócitos B (TAVARES, 2018). Não foi avaliado, até o momento, o papel do VKINA no câncer de mama e sua correlação com a presença de TILs e com o fenótipo do infiltrado (células T CD8+ e CD4).

Desta forma, este estudo tem como objetivo principal a avaliar a expressão de VCAN e seu proteólito (VKINA) nos subtipos moleculares do câncer de mama e correlacionar com a presença de TILs e fatores prognósticos conhecidos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA E SUBTIPOS MOLECULARES

O câncer de mama corresponde a neoplasia mais comum em mulheres e a segunda principal causa de mortes relacionada a câncer, sendo considerado um problema de saúde pública mundial (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2022; SCHNEIDER; D'ORSI, 2009). A incidência tem aumentado cerca de 0,5% nas últimas 2 décadas, enquanto a taxa de mortalidade segue em declínio progressivo, em virtude das políticas de rastreamento, diagnóstico precoce e melhoria nas estratégias de tratamento (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2022). Nos Estados Unidos, a *American Cancer Society* estimou cerca de 287.850 casos novos e 43.250 mortes por carcinoma da mama em 2022 (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2022). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 66.280 casos novos de câncer de mama em 2022, representando a primeira causa de morte por câncer entre as mulheres (Ministério da Saúde, 2022).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes subtipos associados a comportamentos biológicos distintos, que se reflete em significativas mudanças no planejamento terapêutico. Os subtipos intrínsecos podem ser definidos por testes moleculares multiparâmetros como o PAM-50 ou MammaPrint/Blueprint, que apresentam baixa disponibilidade e elevado custo. Na prática clínica, a imuno-histoquímica tem sido utilizada para a classificação, sendo reconhecida pelos consensos mundiais como ferramenta útil no estabelecimento prognóstico e terapêutico do câncer de mama (TAVARES, 2018; COATES et al., 2015).

Baseando-se nela e utilizando 4 marcadores imuno-histoquímicos (receptor de estrógeno – RE, receptor de progesterona – RP, HER-2 e índice proliferativo mensurado pela expressão de Ki-67), o câncer de mama pode ser classificado em luminal A, luminal B (HER-2 positivo ou negativo), triplo negativo e HER 2 enriquecido (Tabela 1) (EHINGER et al., 2017; GOLDHIRSCH et al., 2013). Na prática clínica, visto a implicação terapêutica, assume-se a classificação em luminal (A e B), HER2 enriquecido (receptores hormonais positivos ou negativos) e triplo negativo. Amplos estudos apoiam o valor prognóstico do Ki-67, mas a validação clínica tem se mostrado difícil visto a variabilidade na interpretação e dificuldade de estabelecimento de um ponto de corte ideal (COATES et al., 2015; GOLDHIRSCH et al., 2011).

**Tabela 1** - Definição dos subtipos de câncer de mama

<b>SUBTIPO INTRÍNSECO</b>	<b>DEFINIÇÃO CLÍNICO PATOLÓGICA</b>	<b>NOTAS</b>
<b>LUMINAL A</b>	<b>Luminal A – like:</b> RE e RP positivos HER-2 negativo Ki-67 baixo (<14%) Risco de recorrência baixo com base no ensaio de expressão multigênica (se disponível)	O ponto de corte de Ki-67<14% são considerados como baixo e define de expressão gênica do Luminal A. O ponto de corte de RP ≥20% também é utilizado para determinação do subtipo Luminal A.
<b>LUMINAL B</b>	<b>Luminal B-like (HER-2 negativo)</b> RE positivo e HER-2 negativo e pelo menos um dos seguintes: Ki-67 alto RP negativo ou baixo (<20%) Risco de recorrência alto com base no ensaio de expressão multigênica (se disponível) <b>Luminal B-like (HER-2 positivo)</b> RE positivo e HER-2 superexpresso ou amplificado Qualquer Ki-67 Qualquer RP	Luminal B-like compreende os casos luminais que não possuem as características mencionadas acima. Assim, um valor alto de Ki-67 ou um valor baixo de RP pode ser usado para distinguir entre luminal A-like e luminal B-like (HER-2 negativo).
<b>HER-2 ENRIQUECIDO</b>	<b>HER-2 positivo (não luminal)</b> HER-2 superexpresso ou amplificado RE e RP negativos	
<b>BASAL – LIKE</b>	<b>Triplo negativo:</b> RE, RP, HER-2 negativo	Há uma sobreposição de 80% entre o subtipo triplo negativo e o subtipo basal-like intrínseco. Alguns casos com coloração RE positiva- baixa podem agrupar-se com subtipos não luminais na análise de expressão gênica.

**Legenda:** RE: receptor de estrogênio. RP: receptor de progesterona. HER2: hiperexpressão da proteína HER2. Ki-67: atividade proliferativa.

**Fonte:** adaptado de (GOLDHIRSCH et al., 2013)

Os tumores Luminais A correspondem ao subtipo mais frequente (50-60%) e habitualmente estão associados a bom prognóstico, com elevada sobrevida livre de recorrência e sobrevida global (EROLES et al., 2012; BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). São caracterizados pela hiper-regulação do gene receptor de estrogênio (*ESR-1*) e genes relacionados como *GATA3* e *FOXAI* (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). Estes tumores também apresentam positividade para citoqueratinas luminais com CK8/18 (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). O subtipo Luminal B (HER-2 negativo) é caracterizado por aumento da expressão de *ESR1* e genes proliferativos como *CCNB1*,

*MYBL2* e *MKI67* (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). Habitualmente, são tumores de alto grau e com piores desfechos comparado aos tumores luminais A e, quando não tratados, apresentam um risco de recorrência similar a aqueles triplo-negativos (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018).

O HER-2 enriquecido corresponde a 15% dos casos e está associado a doença multicêntrica/multifocal, maior acometimento linfonodal e comportamento mais agressivo (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). No entanto, o desenvolvimento de terapia alvo com bloqueio da via de sinalização HER-2 promoveu enorme mudança na história natural desse subtipo específico e, conseqüentemente, a melhores desfechos clínicos (GONZALEZ-ANGULO et al., 2009). A expressão do receptor de estrogênio e progesterona pode ser positivo (luminal B HER2 positivo) ou negativo (GOLDHIRSCH et al., 2013). Na avaliação transcriptômica, esses tumores apresentam aumento da expressão do gene *HER2* e genes relacionados à amplificação do *HER2*, como *GRB7* e *TRAP100* no cromossomo 17q12 (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018).

Os tumores do grupo triplo negativo apresentam elevada expressão dos genes *KRT5*, *KRT17*, *CX3CL1*, *ANXA8*, *TRIM29* e a maioria (aproximadamente 75%) apresenta mutação do gene *p53* (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). Citoqueratinas basais como CK 5/6, CK17 e CK19 podem ser identificadas neste subtipo. Morfologicamente, são tumores de alto grau, alto índice mitótico e infiltrado linfocitário (TILS). Clinicamente, são mais frequentes em mulheres jovens e com elevada proporção de tumores grandes e com maior acometimento linfonodal. Esse subtipo apresenta pior prognóstico comparado a tumores luminais, com menor sobrevida livre de recorrência (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018). A maioria dos TN (95%) são classificados histologicamente como carcinomas invasivos sem tipo especial. No entanto, subtipos histológicos raros são descritos como medular, apócrino e adenoide cístico (<1%) e apresentam melhor prognóstico dentre os TNBC (BIANCHINI et al., 2016).

Existe uma heterogeneidade biológica significativa dentro do grupo de pacientes diagnosticados com tumor TN e recentemente, como base na expressão genômica e transcriptômica, foi proposta a classificação em 6 categoriais, ainda não aplicada à prática diagnóstica: basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), imunomodulador (IM), mesenquimal (M), mesenquimal tipo célula-tronco (MSL) e receptor luminal de androgênio (LAR) (AZIM et al., 2020; ZHAO et al., 2020). Outra classificação proposta foi sugerida pelo grupo asiático que classificou o TN em quatro subtipos baseados em mRNA: (I) subtipo LAR, caracterizado pela sinalização do receptor de andrógeno; (II) subtipo IM, mostrando alta sinalização de células

imunes e expressão gênica de sinalização de citocinas; (III) subtipo basal-like e imunossuprimido (BLIS) caracterizado pela ativação do reparo do DNA e regulação negativa dos genes da resposta imune; (IV) subtipo mesenquimal-like (MES), enriquecido em vias de células-tronco de câncer de mama (JIANG et al., 2019). Diversas linhas de pesquisa avaliam as estratégias de tratamento específicas de subtipo para pacientes com TNBC.

## 2.2 FATORES PROGNÓSTICOS ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA

Diversos fatores prognósticos são conhecidos no câncer de mama. A idade é um importante fator prognóstico. Em pacientes com idade inferior a 35 anos, esta doença está associada a pior sobrevida. Foi observado que as taxas de sobrevivência de cinco anos para mulheres com idade menor a 35 anos foram de 75%, versus 83,8% a 88,3% em mulheres de 35 a 69 anos. Comparada a àquelas com idade 50-69 anos, mulheres com idade inferior a 35 anos apresentam maior tumor, maior taxa de tumor multifocal, de alto grau e maior proporção de receptores de hormônio negativo (FREDHOLM et al., 2009).

Estudos populacionais têm demonstrado que idade avançada (maior 65 anos) também se correlaciona a aumento de mortalidade visto estágio avançado ao diagnóstico, comorbidades e discrepâncias de tratamento (EAKER et al., 2006).

Foi observado também que pacientes na pré-menopausa que atingem amenorréia após quimioterapia adjuvante por 6 meses ou mais apresentam melhora da sobrevida global quando comparadas àquelas que amenorréia foi inferior a 6 meses, independentemente do tratamento e do status do receptor de estrogênio (SWAIN et al., 2010).

A etnia negra também se correlaciona a uma biologia tumoral mais agressiva (KEENAN et al., 2015). Em estudo com 280.000 mulheres com câncer de mama não metastático observou que mulheres negras recebiam com maior frequência quimioterapia quando comparada as brancas ( $p=0,001$ ) e essa diferença esteve associada nos estágios mais avançados, tumores de grau mais alto e uma maior proporção de tumores HER2 positivo e TN. Além disso, mulheres negras apresentavam menor taxa de resposta patológica completa (pCR) em tumores HER2-positivos (43% versus 54%,  $p=0,001$ ) e triplo-negativos (37% versus 43%,  $p=0,001$ ), mesmo após ajustes de variáveis (KILLELEA et al., 2015).

O tabagismo, tanto antes quanto após o diagnóstico de câncer de mama, tem sido associado ao aumento da mortalidade por este tipo tumoral. Passarelli et al. (2016) demonstrou que fumantes ativas um ano antes do diagnóstico de câncer de mama eram mais propensas a morrer de câncer de mama quando comparadas àquelas não tabagistas (HR, 1,25; IC 95%, 1,13

a 1,37). Mulheres que cessaram o tabagismo após o diagnóstico tiveram menor mortalidade por câncer de mama (HR, 0,67; IC 95%, 0,38 a 1,19) comparadas àquelas que continuaram.

O estadiamento, que inclui a avaliação do tamanho do tumor primário, acometimento linfonodal regional e presença de metástase à distância, é um importante fator prognóstico. Conforme a *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, a sobrevida livre de doença em 5 anos é de 98-100% no estágio I, 85 – 98% no estágio II e 70-95% no estágio III (AMIN MB, EDGE SB, 2018).

O tamanho tumoral está correlacionado com o envolvimento nodal, mas o valor prognóstico dos dois fatores é independente. Em tumores triplo-negativos, a correlação do tamanho do tumor com o estado nodal é muito mais fraca (FOULKES et al., 2009).

O envolvimento nodal está associado a piores desfechos. Entre as mulheres sem evidência de doença metastática, a sobrevida em 5 anos daquelas com doença localizada (apenas em mama) versus aquela com acometimento nodal foi 99% e 85% respectivamente (SIEGEL RL; MILLER KD, 2017).

A presença de metástase à distância é um importante fator prognóstico. A acometimento visceral associada a perda de função do órgão (crise visceral) está associada a piores desfechos e indica tratamento com quimioterapia, mesmo em pacientes com tumores luminais (BARRIOS et al., 2009).

O grau histológico é considerado fator prognóstico independente (RAKHA et al., 2008). O Ki-67 foi estudado também nesse contexto e correlacionado a maior risco de recidiva e pior sobrevida, tanto em pacientes com e sem acometimento linfonodal. No entanto, é um marcador heterogêneo e de menor reprodutibilidade e por isso, não é recomendado como marcador prognóstico na prática clínica (DE AZAMBUJA et al., 2007).

A presença de invasão linfovascular parece ser um indicador de má evolução, particularmente em tumores de alto grau. Isso foi demonstrado em um estudo de coorte de 1.704 pacientes que não receberam quimioterapia adjuvante sistêmica, em que a invasão linfovascular peritumoral foi um fator de risco independente para recorrência local e morte (PINDER et al., 1994).

A imuno-histoquímica também fornece informações prognósticas importantes. A hiperexpressão de HER-2, em pacientes não submetidos a terapia sistêmica, é marcadora de pior prognóstico, mesmo em tumores menores que 1 cm (GONZALEZ-ANGULO et al., 2009).

Tumores de mama com positividade para receptores hormonais tendem a ser bem diferenciados e apresentam melhor prognóstico (BARTLETT et al., 2011). Positividade do receptor de estrogênio (RE) está associado a menor risco de recorrência nos primeiros cinco

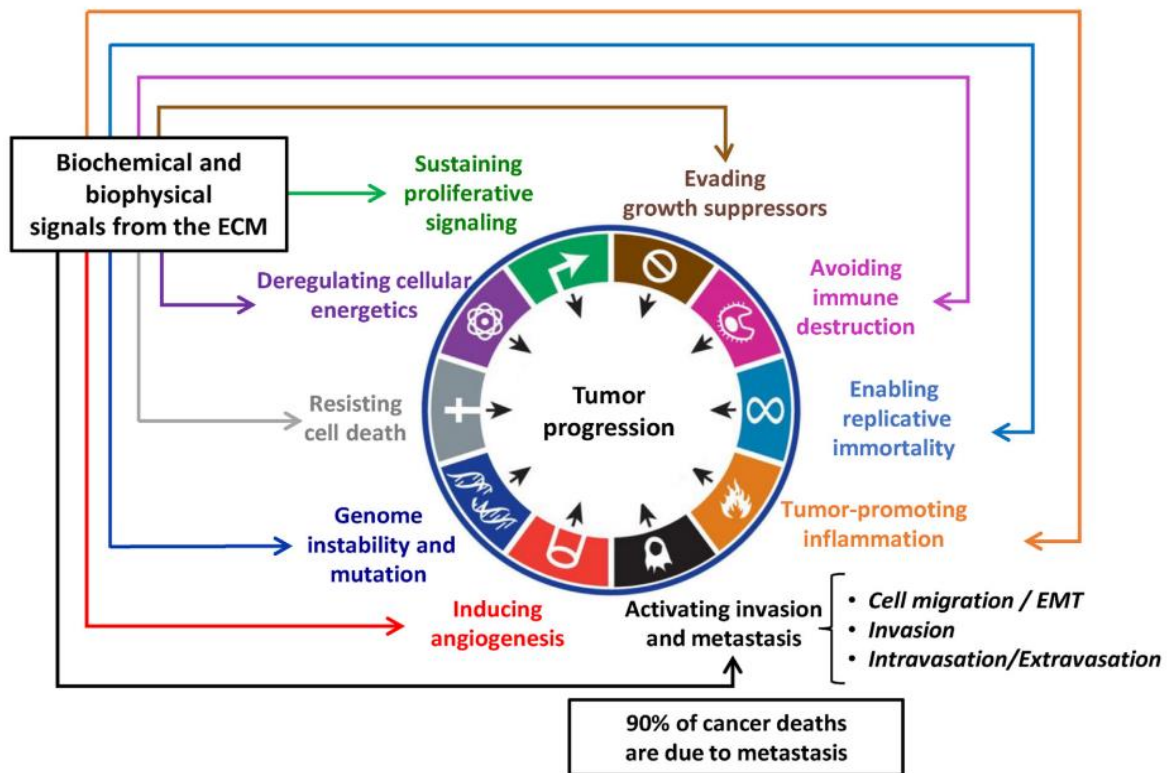
anos após o tratamento inicial quando comparada a pacientes com receptor negativo (9,9% versus 11,5%), no entanto, após cinco anos, apresentam maior taxa de recorrência (5-10 anos: 5,4% versus 3,3%) (COLLEONI et al., 2016). Receptor de progesterona (RP) negativo, independente do receptor de estrogênio, esteve associado a pior sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica (PURDIE et al., 2014). Em geral, os tumores que tem apenas um receptor hormonal positivo (ou seja, RE positivo e RP negativo, ou RP positivo e RE negativo) parecem ter um prognóstico pior do que aqueles que são RE e RP positivo (LI et al., 2020).

A negatividade de receptor de estrogênio, progesterona e HER2 (triplo negativo) está associada a pior prognóstico, com menor sobrevida livre de recorrência (BANDYOPADHYAY et al., 2018).

### 2.3 MICROAMBIENTE TUMORAL E MATRIZ EXTRACELULAR

A desregulação do microambiente tumoral (TME) é uma característica marcante do câncer – Figura 1 (SOCOVICH et al., 2019). TME engloba as células tumorais, células estromais, moléculas sinalizadoras e componentes da matriz extracelular (MEC) (MITTAL et al., 2018).

As células endoteliais desempenham um papel no crescimento tumoral, por oferecer suporte nutricional, e atuam na proteção das células tumorais do sistema imunológico (BORROS, 2019). O macrófago é a célula imune mais proeminente no TME e está envolvido no desenvolvimento e progressão do câncer, promovendo a evasão das células tumorais à resposta imune (BORROS, 2019). Os fibroblastos associados ao câncer apresentam papel importante na secreção das macromoléculas e enzimas de degradação, interferem ativamente no remodelamento da matriz e na migração de células tumorais e endoteliais (HUANG et al., 2021). Outro importante componente do TME são células imunes, como granulócitos, linfócitos e macrófagos, que estão envolvidos nas reações inflamatórias associadas à sobrevivência tumoral (BORROS, 2019).



**Figura 1** - Influência da matriz extracelular nas características do câncer

Fonte: (SOCOVICH et al., 2019)

As células estromais, de modo geral, secretam uma variedade de proteínas da MEC, quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento que podem ativar aberrantemente alças autócrinas e parácrinas, que afetam o comportamento celular (MITTAL et al., 2018).

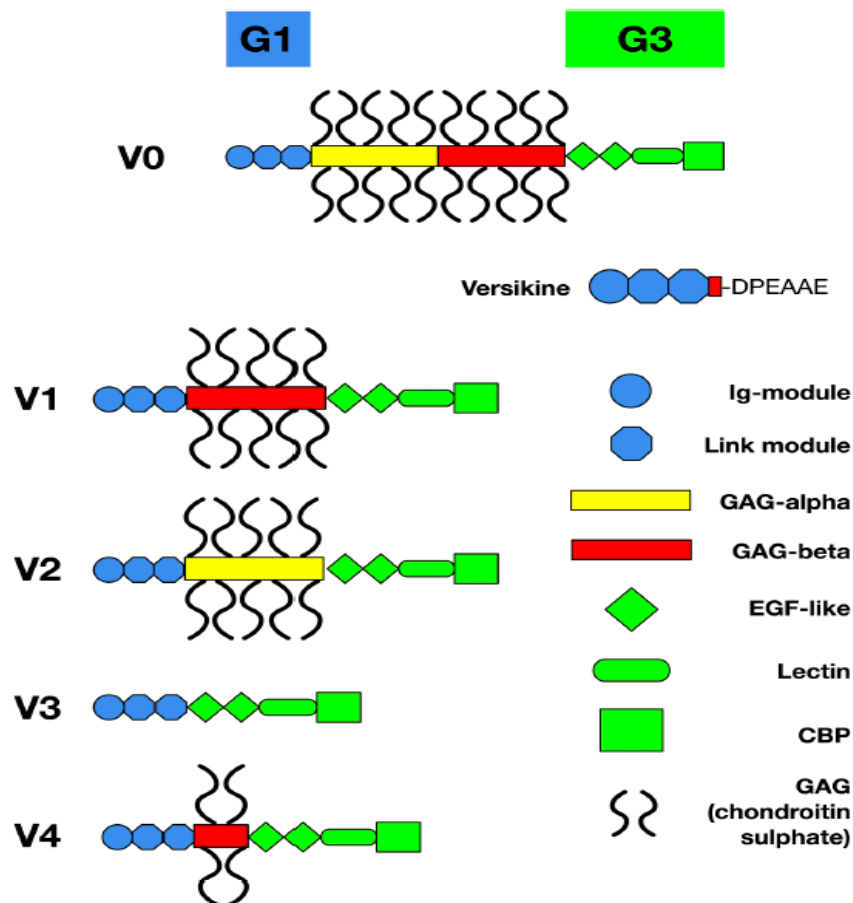
Por sua vez, a MEC corresponde ao componente não celular do estroma do tecido e desempenha diversos papéis biológicos como sustentação, adesão, proliferação e sinalização intracelular. A composição é variável conforme o tecido, mas, basicamente é composta por colágeno, fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurônico, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e enzimas de remodelação. Essas moléculas são produzidas por fibroblastos, células epiteliais, células imunes e endoteliais que compõem o TME (HUANG et al., 2021; NAJAFI et al., 2019).

Portanto, uma compreensão abrangente da desregulação da MEC no TME poderá contribuir para descoberta de biomarcadores e alvos terapêuticos promissores para o tratamento do câncer.



## 2.4 VERSICAN: CONCEITOS E PAPEL NA CARCINOGENESE DO CÂNCER DE MAMA

Versican (VCAN) é um proteoglicano de sulfato de condroitina encontrado na MEC e se apresenta em cinco isoformas: V0, V1, V2, V3 e V4 (Figura 2) (KISCHEL et al., 2010; ASANO et al., 2017). Cada isoforma, exceto V3, tem um glicosaminoglicano (GAG),  $\alpha$  e/ou  $\beta$ , com cadeias de sulfato de condroitina ligadas covalentemente entre os domínios globulares 1 (G1) e 3 (G3) (Figura 3 e 4) (ASANO et al., 2017; HIRANI et al., 2021). O domínio G1 é composto por subunidade semelhante a imunoglobulina (Ig) e o domínio G3 consiste em dois fatores de crescimento epidérmico (EGF), uma proteína de ligação do complemento e um fator de reconhecimento de carboidratos semelhante a lectina - (Figura 3) (PAPADAS et al., 2020).



**Figura 2** - Estrutura das isoformas de versican  
**Fonte:** (PAPADAS et al., 2020)

VCAN é encontrado em uma variedade de tecidos como coração, sistema nervoso, fígado, retina e mama (BODE-LESNIEWSKA et al., 1996). Interage com vários componentes da MEC como ácido hialurônico, fibronectina e integrinas e liga-se às proteínas de superfície celular. Como resultado, VCAN influencia a regulação da motilidade, crescimento e

diferenciação celular e tem sido estudado na embriogênese e em processos patológicos como inflamação e câncer (DU et al., 2010).

No câncer, VCAN pode ser produzida por células tumorais, células estromais, células mielóides e linfócitos associados ao tumor e apresenta papel biológico distinto em cada neoplasia (TSIDULKO et al., 2015; RICCIARDELLI, 2002).

No câncer de mama, a principal fonte desse proteoglicano é a célula estromal, em especial, o fibroblasto (KISCHEL et al., 2010). Ricciardelli e colaboradores (2002), em uma coorte com 58 pacientes com câncer de mama sem acometimento linfonodal, sugeriu que VCAN é depositado na MEC por fibroblastos e que níveis elevados de expressão são associados a menor sobrevida livre de recidiva. No mieloma múltiplo e leucemia aguda, os macrófagos consistem na principal fonte de VCAN (SENDA; FUKUYAMA; NAGASAKA, 2016). Por sua vez, as células tumorais são produtoras de VCAN no câncer de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma de cólon, glioma e câncer de bexiga (PAPADAS et al., 2020).

Na carcinogênese, o VCAN e seus domínios recombinantes estão associados a regulação da proliferação, diferenciação, apoptose, migração e adesão celulares (ASANO et al., 2017; DU et al., 2010).

O VCAN estimula a proliferação celular tumoral através componente *EGF-like* no domínio G3. A hiperexpressão do domínio G3, pela via de sinalização EGFR/AKT/GSK-3b (S9P) no câncer de mama, está associada a multiplicação celular e sugere-se, em modelos experimentais, que esteja correlacionado a resistência a quimioterápicos (DU et al., 2013; DU et al., 2011).

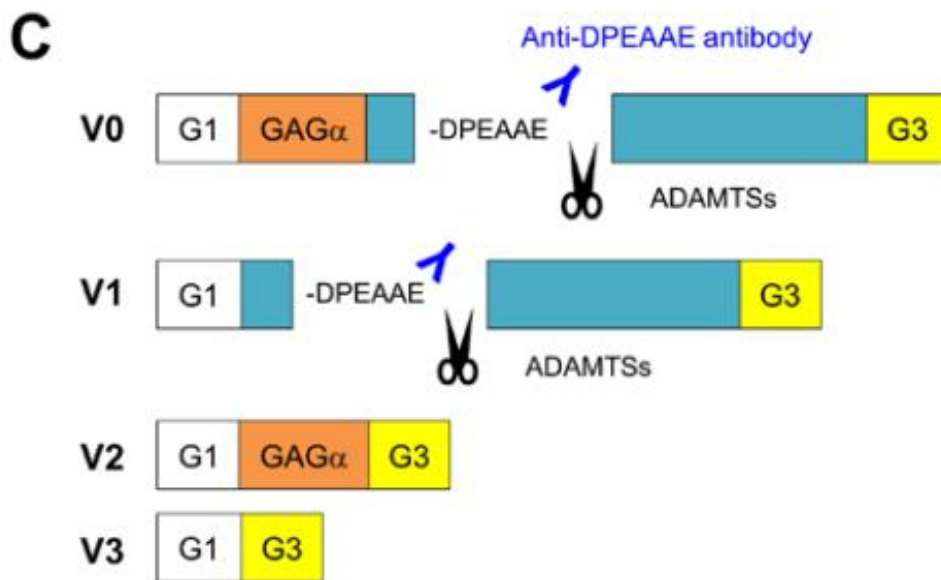
O domínio G1 do VCAN está relacionada redução da adesão e consequente da migração de células tumorais. Tem importante atuação na interface entre processos inflamatórios inatos e respostas imunes adaptativas em câncer, com desregulação da função de células imunes, em especial de células dendríticas e macrófagos (PAPADAS et al., 2020). Não há dados no impacto de VCAN na resposta inflamatória no câncer de mama, bem como a correlação com presença de infiltrado linfocitário associado ao tumor (TILS).

Além disso, o VCAN está associado a expansão da MEC pericelular, via fator de crescimento associado as plaquetas (PDGF) e apresenta papel importante na angiogênese, à medida que favorece a adesão, migração e proliferação das células endoteliais (ZHENG et al., 2004; EVANKO et al., 2001; LAPIERRE et al., 2007). No câncer de mama, o domínio G3 do VCAN interage com os componentes estromais circundantes, fibronectina e VEGF, para promover a neovascularização (YEE et al., 2007).

Sugere-se, nesse sentido, que a alta expressão deste proteoglicano em tumores de mama humanos tenha valor prognóstico, sendo correlacionado a recidiva e menor sobrevida global. No entanto, os dados são escassos na literatura e estudos adicionais são necessários.

## 2.5 PROTEÓLISE DO VERSICAN

Os proteoglicanos presentes na MEC estão sujeitos à degradação no microambiente tumoral. Vários membros da família de A Desintegrina e Metaloproteinase com motivos de Trombospondina (ADAMTS) estão envolvidos na proteólise de VCAN e regulação da MEC e sua expressão aberrante pode ser observada em doenças como aterosclerose e câncer (ASANO et al., 2017; BINDER et al, 2017; KELWICK et al., 2015). ADAMTS-1, -4, -5, -9, -15 e -20 clivam versican em um local específico na região GAG $\beta$  e ADAMTS4 mostrou clivar um adicional, local pouco caracterizado no domínio GAG $\alpha$  (Figura 3) (ASANO et al., 2017).



**Figura 3** - Esquema da quebra do versican  
**Fonte:** adaptado de (ASANO et al., 2017)

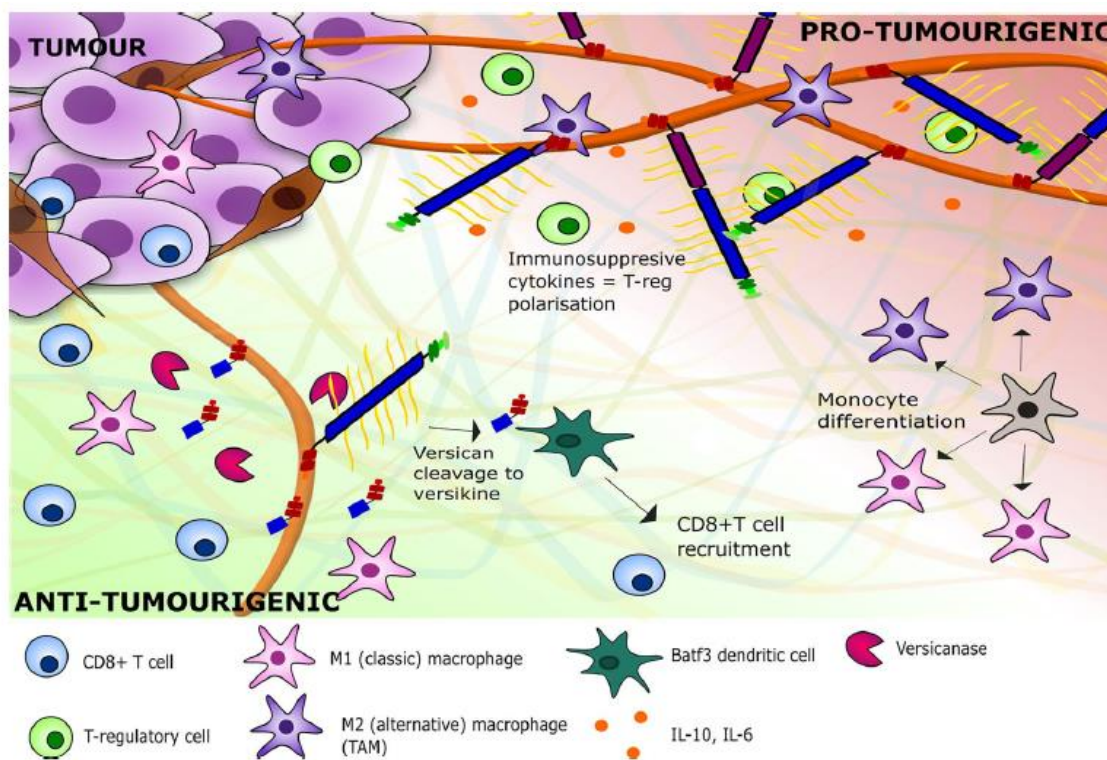
A proteólise da isoforma V1 pela ADAMTS, na ligação Glu441-Ala442, gera um fragmento contendo o domínio G1 N-terminal denominado versikina (VKINA) (PAPADAS et al., 2020). A proteólise de isoformas não-V1 também pode formar fragmentos N-terminal, mas que não tem seu papel determinado (HIRANI et al., 2021).

A VKINA está associada a regulação da imunidade adaptativa contra o tumor com recrutamento de células T CD8 $^{+}$  e polarização de monócitos para macrófagos M1 – Figura 4

(HIRANI et al., 2021). Esse papel foi avaliado especialmente em pacientes com mieloma múltiplo, no qual a VKINA esteve também associada a indução da expressão precoce de IL-6 e IL-1 $\beta$  (HOPE et al., 2016). No câncer de cólon, a proteólise do VCAN e aumento da VKINA esteve associada a aumento da infiltração tumoral de linfócito TCD8+ e foi associada a ativação de células dendríticas (HOPE et al, 2017; PAPADAS et al., 2022).

Estudos sugeriram que a clivagem do VCAN pelas proteases ADAMTS também ocorre durante a remodelação vascular em leiomioma uterino humano. No entanto, a relação espacial e causal entre VCAN, sua clivagem e angiogênese tumoral permanece incompletamente compreendido (ASANO et al., 2017).

O papel do VKINA no câncer de mama ainda é desconhecido.



**Figura 4** - Representação do meio inflamatório de versican V0/V1 e versikina e seus respectivos efeitos na imunidade do tumor

Fonte: (HIRANI et al., 2021)

## 2.6 INFILTRADO LINFOCITÁRIO ASSOCIADO AO TUMOR

O infiltrado linfocitário associado ao tumor (TILs) é descrito em diversos tumores sólidos, incluindo o câncer de mama, e compreende um infiltrado composto por linfócitos T citotóxicos (LT CD8+), células T CD4 e em menor proporção, células *natural – killer* (NK) e linfócito B (SAVAS et al., 2016; ZHOU et al., 2021; OKCU et al., 2022).

TILs pode ser avaliado em lâminas histológicas coradas de hematoxilina e eosina (H&E) com relativa reprodutibilidade entre os patologistas quando utilizadas as recomendações padrões (SAVAS et al., 2016; LOI et al., 2022; GONZALEZ-ERICSSON et al., 2020). São divididos em TILs estromal, quando o infiltrado é observado no estroma adjacente as células tumorais, e intratumoral aquele que apresenta contato direto com a célula tumoral (SAVAS et al., 2016). A percentagem de TILs no estroma tumoral deve realizada utilizando-se os critérios e recomendações descritos por Denkert et al. (2010) e Loi et al. (2013) e uniformizados por Salgado et al. (2014) e pelo *Internacional Immuno-oncology Biomarker Working Group* (TIL – WG) (International TILS Working Group, 2022).

Os TILs estromais apresentam relevância em prognóstico e são preditores de resposta a tratamento no câncer de mama, com frequência e impacto distinto conforme o subtipo molecular (VINGIANI; VIALE; CURIGLIANO, 2020; STANTON; DISIS, 2016; SALGADO et al., 2015; MIYASHITA et al., 2015). A relação entre o percentual de TILs e desfechos oncológicos foi descrita pela primeira vez em 1922 por EXPECTANCY e colaboradores (1922) e as pesquisas nesse campo são crescentes. Destaca-se que seu papel como marcador preditivo de tratamento tem sido investigado.

Os TILs são comumente observados em níveis aumentados em tumores triplo negativos (TN) e HER-2 positivos quando comparado a tumores luminais (MIYASHITA et al., 2015; STANTON; ADAMS; DISIS, 2016).

Em pacientes com câncer de mama TN é observado uma robusta associação do percentual de TILs estromal e desfechos (VINGIANI et al., 2020; LOI et al., 2019). LOI e colaboradores (2019) avaliou 2148 pacientes de 9 estudos com câncer de mama inicial TN tratadas com quimioterapia adjuvante a base de antraciclina com ou sem taxano e observou o percentual médio de TILs correspondeu a 23%, com 77% das pacientes com TILs maior ou igual a 1%. TILs foi menor em pacientes com maior idade, maior tamanho do tumor e maior acometimento nodal. Foi demonstrado que TILs é um fator prognóstico independente em todos os desfechos, de modo que, a cada 10% de aumento do TILs, há uma redução do risco de recorrência de doença invasiva, risco de recorrência a distância e morte em 13% (HR0,87; IC 95% 0,83 - 0,91), 17% (HR0,83; IC 0,79 - 0,88) e 16% (HR0,84; IC 95% 0,79 - 0,89), respectivamente. Em tumores sem acometimento linfonodal e TILs superior a 30%, a sobrevida livre de doença (SLD) invasiva em 3 anos foi de 92%, SLD à distância foi de 97% e sobrevida global (SG) foi de 99%. Outros estudos também demonstraram a associação com aumento da expressão de TILs e desfechos oncológicos (PARK et al., 2019; DE JONG et al., 2020). Apesar

do TILs ser reconhecido como importante fator prognóstico, não é recomendado descalonamento de tratamento padrão conforme expressão de TILs (BAIRI et al., 2021).

No contexto neoadjuvante, a obtenção de resposta patológica completa, definida por ausência de doença invasiva residual em mama e axilas, é um desfecho com correlação com benefício a longo prazo em SLD e SG (HUANG et al., 2020; BAIRI et al., 2021). DENKERT e colaboradores (2018) avaliaram 906 pacientes com câncer de mama TN inicial tratados com quimioterapia neoadjuvante em 6 estudos e observaram que o aumento do TILs em amostras de biópsia estava relacionado ao aumento de resposta patológica completa (pCR). A pCR foi atingida em 31% dos pacientes com TILs baixo (0 – 10%), 31% daqueles com TILs intermediário (11 – 59%) e 50% dos pacientes com TILs elevado ( $\geq 60\%$ ). O aumento da expressão de TILs esteve associada ao aumento de SG no câncer de mama TN, o que não foi verificada em outros subtipos.

Estudos sugerem também que o TILs é preditor de pCR a imunoterapia combinada a quimioterapia em pacientes com câncer de mama TN inicial (CHIEN et al., 2020; LOIBL et al., 2019) e de benefício em longo prazo da imunoterapia combinada a quimioterapia em pacientes com doença TN metastática (CORTES et al., 2020).

No câncer de mama com hiperexpressão de HER-2, tem-se verificado associação similar, com melhora dos desfechos na presença de aumento de TILs naquelas pacientes com câncer de mama inicial ou metastática tratadas com quimioterapia e bloqueio HER-2 (VINGIANI et al., 2020; LOI et al., 2021).

Salgado e colaboradores (2015) randomizaram 455 mulheres com câncer de mama inicial HER-2 positivo para quimioterapia neoadjuvante em associação com trastuzumabe, lapatinibe ou ambos e demonstrou que TILs superior a 5% foi associado a taxas mais altas de pCR, independentemente do grupo de tratamento. O aumento de 1% no TILs foi associado a redução de 3% na taxa de eventos (HR 0,97 IC 95% 0,95 – 0,99 p0,002) em todos os subgrupos avaliados. Dieci et al. (2019) verificou que níveis de TILs superior ou igual a 20% esteve associado a um aumento de SLD à distância quando comparada a TILs inferior a 20% (95,7% versus 91,1%, p 0,025) e que pacientes com câncer de mama com TILs elevado podem se beneficiar de redução do tempo de adjuvância (9 meses) com trastuzumabe, ao contrário daqueles com baixa expressão.

O impacto prognóstico e preditivo do percentual de TILs em tumores luminais ainda é controverso. Sugere-se que TILs elevado esteja associado ao aumento de pCR em tumores luminais, no entanto, o aumento de TILS neste subtipo não está associada a um aumento de SLD e SG, como observado em outros subtipos moleculares (DENKERT et al., 2018). Vingiani

Viale e Curigliano (2020) demonstraram que, em tumores luminais, TILS elevado esteve associado a maior acometimento nodal, grau 3, fenótipo luminal B, baixa expressão de RE e pacientes mais jovens.

O fenótipo do infiltrado inflamatório também impacta no desfecho clínico (TAVARES, 2018). As células T citotóxicas CD8+ são fundamentais para a resposta imune ao tumor e apresentam correlação com melhor sobrevida e resposta ao tratamento (TAVARES, 2018; SALGADO et al., 2015). As células T CD4 *helper* 1 (Th1) facilitam a apresentação de antígeno através da secreção de citocinas e ativação de células apresentadoras de antígeno e tem sido associada a melhora dos desfechos (TAVARES, 2018; SALGADO et al., 2015).

Por outro lado, as células T CD4 *helper* (Th2), incluindo as células T reguladoras CD4+/FOXP3+ inibem a função dos linfócitos T citotóxicos, a proliferação de linfócitos B e promovem uma resposta imune anti-inflamatória, favorecendo o crescimento tumoral (TAVARES, 2018). As células Th17 podem apresentar impactos distintos nos desfechos a depender da citocina produzida (SALGADO et al., 2015).

Em revisão sistemática de 15 estudos, Stanton et al. (2016) demonstrou que a infiltração de células T CD8+ foi encontrada em 48% dos cânceres de mama (variando 32% - 80%), com taxas similares no TN (60%, variando 40 – 91%) e nos tumores com hiperexpressão de HER-2 (61%, variando 32 – 80%). Em tumores luminais, a taxa de TILs CD8+ foi baixa (48%, variando 30 – 73%). Elevadas taxas de células FOXP3+ foi verificada em TN (70%) e HER-2 positivo (67%). A minoria dos tumores de mama luminais demonstrou elevados níveis de infiltração por células T FOXP3+ (38%).

É desconhecida a correlação da presença de infiltrado linfocitário e proteólise de proteoglicano VCAN no câncer de mama, apesar de dados que confirmam essa associação em câncer de cólon, endométrio e mieloma múltiplo e seu papel imunomodulador (PAPADAS et al., 2020; ASANO et al., 2017).

### 3 JUSTIFICATIVA

A desregulação da MEC tem sido alvo de estudos na tentativa de identificação de novos biomarcadores que estejam associados na carcinogênese, apresentem impacto prognóstico e que possam ser avaliados como preditores de tratamento oncológico. O VCAN tem sido estudado nesse contexto e no câncer de mama, foi observado uma associação com aumento de recidiva e maior grau (RICCIARDELLI et al, 2002; SUWIWAT et al., 2004). No entanto, a literatura é escassa e não se estabeleceu correlação entre sua expressão, os subtipos moleculares e fatores prognósticos conhecidos. O proteólito da degradação deste proteoglicano (VKINA) correlaciona-se a infiltração tumoral de linfócito TCD8+ (HOPE et al, 2017) e estuda-se seu papel na modulação na resposta imune. No câncer de mama, não há dados sobre a expressão de VKINA e não há estudos da sua relação com infiltrado linfocitário (TILs), que é fator prognóstico e preditivo conhecido nesta patologia.

O presente estudo investigou a expressão do VCAN e o proteólito (VKINA) nos subtipos moleculares de carcinomas de mama e buscou estabelecer associação com a presença de TILs, marcadores prognósticos já conhecidos e desfechos oncológicos.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de versican e sua proteólise nos subtipos moleculares de câncer de mama em mulheres.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar expressão de versican e versikina nos subtipos moleculares e correlacionar com fatores clínico patológicos;
- Avaliar correlação da expressão da versikina e presença de TILs nos subtipos moleculares;
- Avaliar a correlação da expressão de versican e versikina e expressão de CD4 e CD8+;
- Avaliar a correlação da expressão de versican e versikina com desfecho oncológico de sobrevida livre de recidiva e de doença.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 DESENHO E TIPO DE ESTUDO

É um estudo observacional, descritivo, de natureza semiquantitativa e de amostra por conveniência. Foi utilizada uma coorte retrospectiva.

### 5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO E COLETA DE DADOS

A população do estudo foi composta por casos de pacientes diagnosticadas com câncer de mama invasivo de tipo não especial (OMS, 2018), maiores de 18 anos, submetidas a tratamento cirúrgico primário, acompanhadas na Clínica AMO (Assistência Multidisciplinar em Oncologia), no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2020.

As pacientes potenciais foram identificadas a partir do registro eletrônico de prontuários da clínica, empregando o CID-10 C50. Foram selecionadas àquelas pacientes que o material biológico foi avaliado no laboratório de patologia do IMAGEPAT. As pacientes foram contactadas e foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (conforme descrito em aspectos Éticos).

A lista das pacientes selecionadas para o estudo foi enviada ao laboratório de patologia IMAGEPAT. Posteriormente, foi disponibilizado do arquivo para análise as lâminas de H&E, as lâminas de imuno-histoquímica e os blocos de parafina. Os casos foram revisados por patologista com experiência em patologia mamária e aqueles com material escasso foram excluídos (conforme descrito em critérios de exclusão). Foram selecionados os blocos de parafina com maior representatividade da neoplasia e encaminhados para processamento (conforme descrito abaixo).

Foram coletados dados demográficos, clínicos, patológicos e de tratamento, empregando ficha de coleta estabelecida para esse estudo (Anexo A), a partir das informações registradas no prontuário médico das pacientes. Todos os dados foram tabulados em planilha Excel.

O estadiamento foi realizado empregando-se a sétima edição da *American Joint Committee (AJCC)* (AMMOURI; HAMADE, 2014).

O câncer de mama foi classificado em subtipos moleculares: subtipos luminais (RE e/ou RP positivo), HER2 enriquecido (HER-2 positivo, independente do status dos receptores hormonais) e triplo negativo (RE, RP e HER-2 negativo).

### 5.3 SELEÇÃO DO GRUPO CONTROLE

Para o grupo controle, foram selecionadas pacientes submetidas a mamoplastia, com resultado anatomopatológico como “mama normal”, selecionadas através de registro de dados do laboratório de patologia IMAGEPAT. As pacientes foram contactadas e foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (conforme descrito em aspectos Éticos). Data de nascimento e data da cirurgia foram obtidos no prontuário deste laboratório (Anexo B).

### 5.4 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de câncer de mama invasivo de tipo não especial, como idade maior ou igual a 18 anos, atendidas na Clínica AMO (Assistência Multidisciplinar em Oncologia), no período de 2010 a 2020, submetida a tratamentos cirúrgicos.

### 5.5 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- Recusa na participação do estudo.
- Ausência de material biológico disponível no arquivo do departamento de Anatomia Patológica do laboratório IMAPEGAT.
- Material biológico escasso ou insuficiente.
- Paciente submetidas a tratamento sistêmico ou radioterapia prévios a ressecção cirúrgica.
- Pacientes sem dados do seguimento clínico.

### 5.6 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

Secções histológicas de 4 $\mu$ m foram obtidas dos fragmentos mamários fixados em formol neutro tamponado com fosfato a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e coradas pela técnica da Hematoxilina-Eosina (H&E).

## 5.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para a imuno-histoquímica, os anticorpos primários utilizados estão listados na tabela 1.

**Tabela 2** - Lista de anticorpo e as respectivas diluições adotadas

ANTICORPO	CLONE	MARCA	DILUIÇÃO
Versican	12C5	DSHB	1:50
Versikina	Policlonal	ThermoFisher Scientific	1:500
CD4	SP35	Abcam	1:80
CD8+	Ab 4055	Abcam	1:400
RE	SP1	Roche/Ventana	Pronto para uso
RP	1E2	Roche/Ventana	Pronto para uso
HER2	4B5	Roche/Ventana	Pronto para uso
KI67	MIB-1	Roche/Dako	Pronto para uso

Fonte Elaborado pela autora

A imuno-histoquímica para receptor de estrógeno, receptor de progesterona, Ki-67 e receptor HER-2 foram revisadas nas amostras selecionadas nos cortes armazenados em laboratório de referência por patologista.

## 5.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CD8

A imuno-histoquímica foi realizada em secções de 4µm, obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas silanizadas (*StarFrost*), com o anticorpo monoclonal anti- anti-CD8 (Abcam, clone Ab 4055)

Para detecção de CD8, as secções foram desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em álcool absoluto, 90% e 80%. A recuperação antigênica foi realizada em calor úmido (panela de pressão elétrica a 97° por 20 minutos) com tampão citrato 10mM, pH6.

Os cortes foram lavados em PBS, posteriormente, adicionado bloqueio peroxidase endógena com água oxigenada (Farmax/ volume 10) por 10 min, repetido por 4 vezes.

Os cortes foram novamente lavados em PBS e incubados com Protein Block (Novolink™ Max Polymer Detection System) por 30 min.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-CD8 em temperatura ambiente por 1h. A revelação polimérica foi realizada conforme instruções do fabricante (Novolink™ Max Polymer Detection System) – tempo de revelação 3 min. As secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina (Novolink™ Max Polymer Detection System) e contra-coradas com hematoxilina. Ao final, as lâminas foram desidratadas com álcool e xilol, montado em Entellan e visualizado ao microscópio. Os controles consistiram na substituição dos anticorpos primários por soro normal, sendo invariavelmente negativos. Os controles positivos foram feitos em secções de amígdalas.

## 5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA CD4

A imuno-histoquímica foi realizada em secções de 4µm, obtidas de cada caso e coletadas sobre lâminas silanizadas (*StarFrost*), com o anticorpo monoclonal anti-CD4 (Abcam, clone SP35).

Para detecção de CD4, foi utilizado Trilogy (Cell Marque 920P-07 RUO) para desparafinizar e re-hidratar. A recuperação antigênica foi realizada em calor úmido (panela de pressão elétrica a 97° por 20 minutos, com tampa aberta) com Trilogy (Cell Marque 920P-07 RUO).

Os cortes foram lavados em PBS (INVITROGEN AM9625, ph7,4), posteriormente, adicionado bloqueio peroxidase endógena (Novolink™ Max Polymer Detection System) com peróxido 10 vol.

Os cortes foram novamente lavados em PBS (INVITROGEN AM9625, ph7,4) e incubados com Protein Block (Novolink™ Max Polymer Detection System) por 30 min.

Posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos anti-CD4 em geladeira a 4°C overnight. A revelação polimérica foi realizada conforme instruções do fabricante (Novolink™ Max Polymer Detection System) – tempo de revelação 1 min. Ao final, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina por 1 min (Novolink™ Max Polymer Detection System). As secções foram contra-coradas com hematoxilina e posteriormente desidratados com álcool e xilol, montado em Entellan e visualizado ao microscópio. Os controles consistiram na substituição dos anticorpos primários por soro normal, sendo invariavelmente negativos. Os controles positivos foram feitos em secções de amígdalas.

## 5.10 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA VERSICAN E VERSIKINA

Nesta técnica, utilizou-se anticorpos primários (Tabela 2) para detecção de versican (12C5, DSHB) e neo-epítipo de versican DPEAAE (VKINA) (policlonal, ThermoFisher Scientific), conforme as diluições definidas na tabela 2.

As secções foram desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em álcool absoluto, 90% e 80%. A recuperação antigênica foi realizada em calor úmido (panela elétrica de arroz a 100° por 10 minutos) com tampão citrato EDTA, pH6.2.

Os cortes foram lavados em PBS, posteriormente, adicionado bloqueio peroxidase endógena (Novolink™ Max Polymer Detection System) com peróxido 10 vol.

Os cortes foram novamente lavados em PBS e submetidos a recuperação enzimática com 0.5 U/mL de condroitinase ABC (*Proteus vulgaris*; Sigma Chemicals) em 0.25 M de tampão Tris (pH 8.0) contendo 0.18 M de cloreto de sódio e 0.05% de albumina sérica bovina (BSA), a temperatura de 37 °C durante 1 hora e 30 minutos. Para inibir a atividade da protease, foi utilizada uma solução de 0.25 M de tampão Tris (pH 8.0) contendo 0.1 M 6-amino-n-ácido-capróico e 5 mM de cloridrato de benzamidina por 30 minutos (adaptado de ERDÉLYI et al., 2005). Posteriormente, os cortes foram incubados com Protein Block (Novolink™ Max Polymer Detection System) por 30 min.

As lâminas foram incubadas overnight com os anticorpos em temperatura ambiente. A revelação polimérica foi realizada conforme instruções do fabricante (Novolink™ Max Polymer Detection System) – tempo de revelação 3min. Ao final, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina por 1 min (Novolink™ Max Polymer Detection System).

As secções foram contra-coradas com hematoxilina e posteriormente desidratados com álcool e xilol, montado em Entellan e visualizado ao microscópio. Os controles consistiram na substituição dos anticorpos primários por soro normal, sendo invariavelmente negativos. As áreas de pele e região perivascular contidas nos cortes serviram como controles positivos da reação.

## 5.11 HISTOPATOLOGIA

A identificação do tipo histológico seguiu a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para as neoplasias mamárias humanas (WHO Classification of Tumours - Breast Tumours, 2019) e foi realizada por patologista com experiência em patologia mamária, em microscópio OLYMPUS CX31, campo 0,60, objetiva 40x.

## 5.12 GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA

O grau histológico dos tumores foi determinado de acordo com o Sistema de Gradação de Scaff Bloom & Richardson modificado por Elton & Elis, por patologista especialista em patologia mamária em microscópio OLYMPUS CX31. Para definição do grau de Nottingham, três parâmetros foram avaliados: formação tubular/ glandular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico. Cada uma dessas variáveis recebeu uma pontuação de 1 a 3 e o escore final de 3 a 9 determinou o grau histológico (Tabela 3).

O grau tubular corresponde a avaliação da proporção de estruturas tubulares na área tumoral. Tumores com mais de 75% da área carcinomatosa formada por túbulos corresponderam ao escore 1. O escore 2 correspondeu aquele tumor 10% - 75% de estrutura tubular e escore 3 entre 0 - 10%.

O índice mitótico foi examinado através da contagem do número de figuras de mitose milímetro quadrado (*high-power-fields* - HPF) consecutivos na área mais mitoticamente ativa do tumor.

O pleomorfismo nuclear corresponde ao tamanho e forma dos núcleos das células tumorais e o parâmetro utilizado são as células normais adjacentes ao tumor. Núcleos pequenos e regulares com cromatina uniforme foram classificados como escore 1 para este segundo parâmetro, núcleos de tamanho maior e com variabilidade na forma foram considerados escore 2 e células com grande variação no tamanho e forma do núcleo (bizarros, e com múltiplos nucléolos) foram considerados escore 3.

**Tabela 3** - Grau Histológico de Nottingham.

<b>PONTOS</b>	<b>GRAU DE NOTTINGHAM</b>
3-5	Grau 1 - baixo grau
6-7	Grau 2 – grau intermediário
8 – 9	Grau 3 – alto grau

**Fonte:** (WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS - BREAST TUMOURS, 2019)

### 5.13 AVALIAÇÃO DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A intensidade do infiltrado inflamatório foi avaliada, sob ampliação 200-400x em microscópio óptico (Olympus CX31, ocular 22mm), secção de H&E (4  $\mu\text{m}$ ), contendo material tumoral representativo de cada caso. Foi determinada pela percentagem de TILs no estroma tumoral, ou seja, a área do infiltrado ocupado por células inflamatórias mononucleares (excluindo os polimorfonucleares e macrófagos) do estroma peritumoral, dentro das bordas do tumor invasivo, utilizando-se os critérios e recomendações descritos por Denkert et al. (2010) e Loi et al. (2013) e uniformizados por Salgado et al. (2014) e pelo *Internacional Immunology Biomarker Working Group (TIL – WG)* (International TILS Working Group, 2022) (WHO Classification of Tumours - Breast Tumours, 2019). Foi excluído, conforme recomendação, TILs fora da borda do tumor, em zonas tumorais com artefatos de esmagamento, necrose ou hialinização. De acordo com o TIL-WG, pacientes com 0-10% de escore foram agrupados em baixo, 20-40% como intermediário e 50% ou mais como elevado TILs. Esta avaliação foi realizada por patologista com experiência em patologia mamária e dois outros observadores treinados.

### 5.14 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4 E CD8+

Nas áreas com maior infiltrado de linfócitos associados ao tumor, cinco campos contendo células positivas para CD4 e CD8+ foram fotografados manualmente com uma câmera numérica (Leica LMD6500, abertura 0,6, objetiva 40x e Leica DMi8, abertura 0,6, objetiva 40x, para CD4 e CD8+ respectivamente) por equipe treinada, sem conhecimento dos dados clínicos. Foi realizada a contagem manual do número total de células positivas no estroma para cada marcador avaliado utilizando-se o equipamento *Software ImageJ*. Em cada uma das replicatas técnicas dos casos foi delimitada uma área, obtendo-se assim o número de células marcadas por  $\mu\text{m}^2$  e, posteriormente, foi calculada a média do número de células marcadas/  $\mu\text{m}^2$  em cada caso.

### 5.15 AVALIAÇÃO DE VERSICAN E VERSIKINA

A expressão de versican e neo-epítopo DPEAAE (VKINA) foi avaliada no citoplasma de células epiteliais e no estroma das áreas adjacentes a proliferação epitelial maligna. A análise de versican e versikina se deu de forma semi-quantitativa, incluindo a porcentagem da área



positivamente marcada (0-100%) e a intensidade de marcação para o proteoglicano (1-4). De acordo com a escala, (1) é considerado negativo ou muito fraco, (2) positivo fraco, (3) positivo moderado e (4) positivo forte (SKANDALIS et al., 2011). No estroma, o grau de expressão de versican e versikina (escore de VCAN e VKINA) foi então dado pela multiplicação da porcentagem (0-100%) pela intensidade (1-4). Os escores de expressão de VKINA e VCAN foram categorizados após o cálculo da mediana e definição dos percentis 25% e 75%. Para a análise da presença de VKINA no citoplasma de células epiteliais malignas, foi considerada a intensidade de marcação e a área marcada conforme descrito anteriormente. Dois pesquisadores avaliaram aleatoriamente os espécimes utilizando esse método.

#### 5.16 DESFECHOS

Sobrevida livre de doença foi definida como o tempo entre a cirurgia e recorrência radiológica, clínica ou patológica ou última avaliação. Sobrevida global foi considerada como o tempo entre a cirurgia e a data do óbito ou data da última avaliação.

#### 5.17 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido a avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FIOCRUZ/CPqGM e aprovado para execução sob o nº CAAE 65210017.9.0000.0040. As pacientes foram contactadas a fim de serem informadas sobre a natureza da pesquisa. A voluntariedade na participação desse projeto se fez mediante assinatura das participantes ou de seus representantes legais, do termo de consentimento (Anexo C e D), seguindo as normas do Ministério da Saúde.

#### 5.18 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Após tabulação dos dados, foram realizadas análises descritivas dos dados obtidos. A escolha entre testes paramétricos e não paramétricos foi baseado no teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Análise de correlação de Spearman foi aplicada para avaliar as possíveis correlações entre os parâmetros avaliados. Na comparação das médias entre os grupos, foi aplicado o teste T de Student para amostras independentes. O teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes foi usado na comparação entre as categorias de VCAN e VKINA estromal. As variáveis paramétricas foram submetidas ao teste de Análise de Variância para

medidas repetidas (One Way ANOVA) seguidos do teste de Tukey para comparação entre os grupos. Para as variáveis categóricas, foi utilizado o teste do qui-quadrado que serviu para comparações das proporções entre os grupos com a avaliação dos resíduos padronizados ajustados. A análise de Kaplan-Meier foi usada para construção da função de sobrevida e o teste do log-rank serviu para a comparação entre os diferentes grupos. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ , para intervalo de confiança de 95%, com análise bicaudal. Os programas estatísticos SPSS® 26.0 para Windows e GraphPad Prism 8.0.2 foram utilizados para análises estatísticas.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES

No período de janeiro de 2010 a janeiro de 2020, 164 pacientes foram selecionadas para análise. Foram excluídos 82 pacientes, sendo 34 pacientes por recusa ao consentimento, 12 pacientes por amostra escassa, 7 por realização de quimioterapia prévia, 14 pacientes por perda de seguimento, 20 pacientes por amostra analisada em laboratório externo de patologia. Após processamento das amostras, 5 pacientes foram excluídos por ausência de tumor na lâmina. Foram elegíveis para participação do estudo 72 pacientes (Figura 5). A idade média foi 59 anos (33 – 92 anos), 1,4% tinham idade inferior a 35 anos. A maioria das pacientes (72,2%) estava na pós-menopausa (tabela 4).

Cirurgia conservadora foi realizada em 58 pacientes (80,6%). Esvaziamento axilar foi realizada também em 14 pacientes (19,4%) e 5 pacientes daquelas submetidas a mastectomia realizaram esvaziamento axilar. Quimioterapia adjuvante foi realizada em 66,7% das pacientes, sendo o esquema preferencial a base de antraciclina (43,7%) (tabela 4).

Durante o seguimento, 7 pacientes (9,7%) apresentaram recidiva de doença e 5 pacientes foram à óbito (6,9%), sendo 3 por morte associada ao câncer e as demais por causa desconhecida (tabela 4).



**Figura 5** - Disposição dos pacientes

Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 4** - Características clínicas da população estudada

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>POPULAÇÃO (72 PACIENTES)</b>
<b>Idade</b>	
Média	59 anos (33 – 92 anos)
< 35 anos	1 (1,4%)
<65 anos	23 (31,9%)
≥65 anos	48 (66,7%)
<b>Status menopausal</b>	
Pré menopausa	20 (37,8 %)
Pós menopausa	52 (72,2%)
<b>Cirurgia mamária</b>	
Mastectomia	14 (19,4%)
Quadrantectomia	58 (80,6%)
<b>Abordagem axilar</b>	
Esvaziamento axilar	14 (19,4%)
Biópsia de linfonodo sentinela	58 (80,6%)
<b>Quimioterapia adjuvante</b>	
Antracilina	21 (43,7%)
Taxano	23 (47,9%)
<b>Recidiva de doença</b>	
	7 (9,7%)
<b>Status</b>	
Óbito (por qualquer causa)	5 (6,9%)
Óbito por câncer	3 (4,2%)

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 6.2 CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS DA POPULAÇÃO AVALIADA

O estadiamento patológico mais frequente foi o estágio I (48,6%). Uma paciente apresentava doença metastática ao diagnóstico (tabela 5).

A média de tamanho do tumor foi 19,5mm (6 – 55mm). A maioria das pacientes (59,7%) apresentava tumor menor que 2 cm (tabela 5).

Acometimento linfonodal axilar esteve presente em 27 pacientes (37,5%), com média de 1,6 linfonodos acometidos (1-25). Acometimento micrometastático linfonodal foi verificado em 6 pacientes (tabela 5).

Na avaliação do grau histológico final, a maioria das pacientes (50%) apresentam tumor com grau histológico final 3, enquanto 34,7% apresentam tumores com grau 2. Índice mitótico grau 1 ocorreu em 40,3% dos casos, enquanto grau nuclear e tubular 3 foram os mais frequentes, correspondendo a 62,5% e 72,2% respectivamente (tabela 5).

**Tabela 5 - Características anatomopatológicas da população estudada**

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>POPULAÇÃO (72 PACIENTES)</b>
<b>Estadiamento patológico</b>	
I	35 (48,6%)
II	29 (40,3%)
III	7 (9,7%)
IV	1 (1,4%)
<b>Tumor (mm)</b>	
	19,5mm (6mm – 55mm)
T1	43 (59,7%)
T2	28 (38,9%)
T3	1 (1,4%)
<b>Linfonodo axilar acometido</b>	
	27/72 (37,5%)
N1mi	6 (22,2%)
N1	13 (48,2%)
N2	4 (14,8%)
N3	4 (14,8%)
<b>Grau histológico final</b>	
1	11 (15,3%)
2	25 (34,7%)
3	36 (50%)
<b>Grau nuclear</b>	
1	2 (2,8%)
2	25 (34,7%)
3	45 (62,5%)
<b>Índice Mitótico</b>	
1	29 (40,3%)
2	20 (27,8%)
3	23 (31,9%)
<b>Grau tubular</b>	
1	4 (5,6%)
2	16 (22,2%)
3	52(72,2%)

Fonte: Elaborado pela autora

### 6.3 CARACTERÍSTICAS IMUNO-HISTOQUÍMICAS DA POPULAÇÃO AVALIADA

Os receptores de estrógeno e progesterona estavam positivos em 86,1% e 80,6% dos casos, respectivamente. Todas as amostras com receptor de progesterona positivo apresentavam

positividade para receptor de estrógeno. Quatro casos tinham receptor de estrógeno positivo e receptor de progesterona negativo. O HER-2 foi positivo em 14 casos, sendo que todos com expressão HER-2 3+ na análise imuno-histoquímica. Todos os casos com HER-2 2+ na imuno-histoquímica apresentavam FISH negativo (informação cedida pelo laboratório). Positividade dos receptores hormonais associado a HER-2 negativo ocorreu em 49 pacientes, correspondendo a 68,0% dos casos (tabela 6).

O Ki67 médio foi 38%, sendo que em 84,7% dos casos estavam acima 14%, cutoff estabelecido por *St. Gallen International Breast Cancer Conference* (GOLDHIRSCH et al., 2013) (tabela 6).

O subtipo molecular mais frequente foi o luminal B/HER-2 negativo, correspondendo a 54,2%. O subtipo luminal A, luminal B/HER2 positivo, HER-2 enriquecido, triplo negativo correspondeu a 13,9%, 18%, 1,4% e 12,5%, respectivamente (tabela 7). Realizado também avaliação da frequência conforme subtipo molecular utilizado na prática clínica, conforme descrito em metodologia. O subtipo luminal (RE e/ou RP positivo) foi o mais comum, correspondendo a 68,1% (49 casos), seguida do HER-2 superexpresso (HER-2 positivo, independente do status de RE e RP) (19,4%) e triplo negativo (HER-2, RE, RP negativo) (12,5%).

**Tabela 6** - Características imuno-histoquímicas da população estudada

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>POPULAÇÃO (72 PACIENTES)</b>
<b>Receptor de Estrógeno</b>	
Negativo	11 (15,3%)
Positivo	61 (86,1%)
0 – 10%	0 (0%)
11 - 100%	61 (86,1%)
<b>Receptor de Progesterona</b>	
Negativo	14 (19,4%)
Positivo	58 (80,6%)
1-10%	5 (8,6%)
11-100%	53 (91,4%)
<b>HER2</b>	
0	39 (54,2%)
1+	13 (18,1%)
2+	6 (8,3%)
3+	14 (19,4%)
<b>Ki67 (médio)</b>	
≤14%	10 (13,9%)
>14%	61 (84,7%)
Não determinado	1 (1,4%)

Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 7** - Subtipos moleculares na população estudada

<b>SUBTIPOS</b>	<b>POPULAÇÃO (72 PACIENTES)</b>
Luminal A	10 (13,9%)
Luminal B/HER2 negativo	39 (54,2%)
Luminal B/ HER2 positivo	13 (18,0%)
HER2 enriquecido	1 (1,4%)
Triplo negativo	9 (12,5%)

Fonte: Elaborado pela autora

O TILs baixo (0-10%) foi verificado em 49 pacientes (68,0%), enquanto níveis elevados de TILs (50 – 90%) foi constatado em 10 casos (13,9%) (tabela 8).

A expressão de CD4 foi realizada em 64 casos, com média de contagem de  $4,88 \times 10^{-3}$  céls/  $\mu\text{m}^2$ , enquanto a expressão de CD8+ foi realizado em 67 casos, com  $3,15 \times 10^{-3}$  céls /  $\mu\text{m}^2$  (tabela 8).

**Tabela 8** - Avaliação de TILS e da expressão de CD4+ e CD8+ na população estudada

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>POPULAÇÃO (72 PACIENTES)</b>
<b>TILS</b>	
Baixo	49 (68,0%)
Intermediário	13 (18,0%)
Alto	10 (14,0%)
<b>CD4 (média céls/ <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	$4,88 \times 10^{-3}$ (0 - $0,26 \times 10^{-3}$ )
<b>CD8+ (média céls/ <math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	$3,15 \times 10^{-3}$ (0 - $0,101 \times 10^{-3}$ )

**Obs.:** Nas análises de CD4 e CD8+, foram avaliados 64 e 67 casos respectivamente.

**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 6.4 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO GRUPO CONTROLE

Foram selecionadas 16 pacientes para o grupo controle. Todas as pacientes tinham sido submetidas a cirurgia de mamoplastia redutora e sem achados patológicos. A média de idade foi 57 anos (55-65).

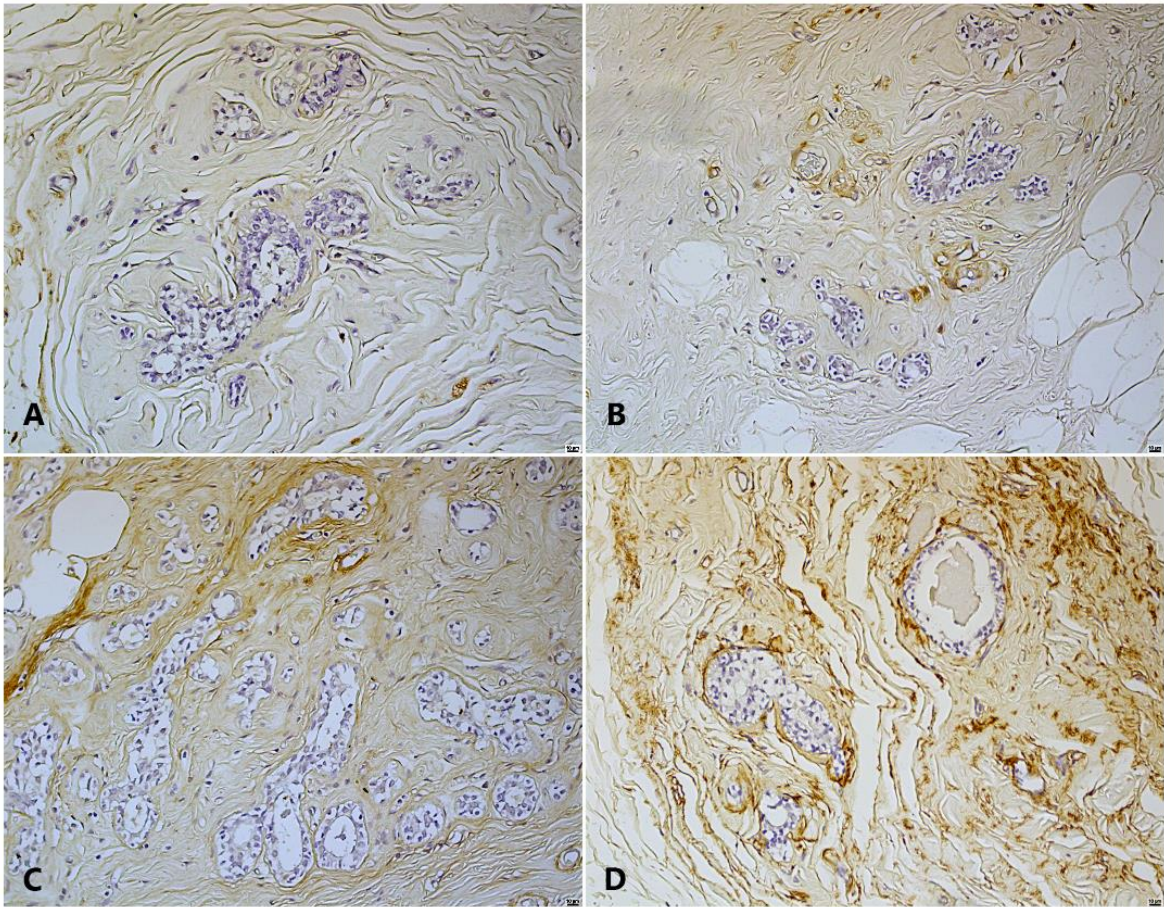
A expressão de VCAN foi avaliada em 15 pacientes e, apesar de 46,7% delas revelarem forte intensidade, todas apresentaram escore final inferior a 41,25 (Tabela 9; figura 6). Na análise de VKINA em 12 pacientes, 75% dos casos mostraram intensidade negativa ou fraca e a maioria (83,3%) apresentou escore entre 37,5 e 142,5 (Tabela 9; figura 7).



**Tabela 9** - Avaliação de VCAN e VKINA no grupo controle e grupo de casos

	<b>GRUPO CONTROLE</b>	<b>GRUPO CASOS</b>
<b>VCAN Intensidade</b>	15 pacientes	72 pacientes
1 (negativo ou muito fraca)	3 (20%)	22 (30,6%)
2 (positivo fraco)	1 (6,6%)	13 (18,0%)
3 (moderado)	4 (26,7%)	22 (30,6%)
4 (positivo forte)	7 (46,7%)	15 (20,8%)
<b>VCAN Escore categorizado</b>	15 pacientes	72 pacientes
<41,25	15 (100%)	16 (22,2%)
$41,25 \leq x < 157,5$	0 (0%)	37 (51,4%)
$\geq 157,5$	0 (0%)	19 (26,4%)
<b>VKINA Intensidade</b>	12 pacientes	72 pacientes
1 (negativo ou muito fraca)	9 (75%)	7 (9,7%)
2 (positivo fraco)	2 (16,7%)	20 (27,8%)
3 (moderado)	1 (8,3%)	18 (25%)
4 (positivo forte)	0 (0%)	20 (27,8%)
Não avaliado	0 (0%)	7 (9,7%)
<b>VKINA Escore categorizado</b>	12 pacientes	72 pacientes
<37,5	0 (0%)	14 (19,5%)
$37,5 \leq x < 142,5$	10 (83,3%)	34 (47,2%)
$\geq 142,5$	2 (16,7%)	17 (23,6%)
Não avaliado	0 (0%)	7 (9,7%)

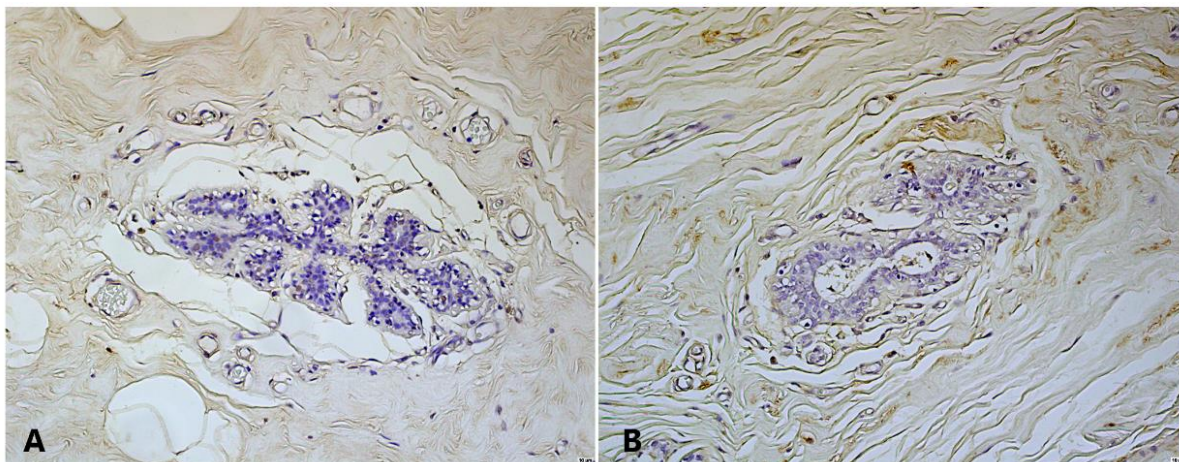
**Fonte:** Elaborado pela autora



**Legenda:** (A) Imunomarcção negativa ou positiva muito fraca de versican no estroma mamário normal. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (B) Imunomarcção positivo fraco de versican no estroma adjuvante a células do carcinoma invasor. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (C) Imunomarcção positivo moderado de versican no estroma mamário normal. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (D) Imunomarcção positivo intenso de versican no estroma mamário normal. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x.

**Figura 6 - Imunomarcção de versican no estroma mamário normal**

**Fonte:** Elaborado pela autora



**Legenda:** (A) Imunomarcção negativa ou positiva muito fraca de versikina no estroma mamário normal. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (B) Imunomarcção positivo fraco de versikina no estroma adjuvante a células do carcinoma invasor. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x.

**Figura 7** - Imunomarcção de versikina no estroma mamário normal

**Fonte:** Elaborado pela autora

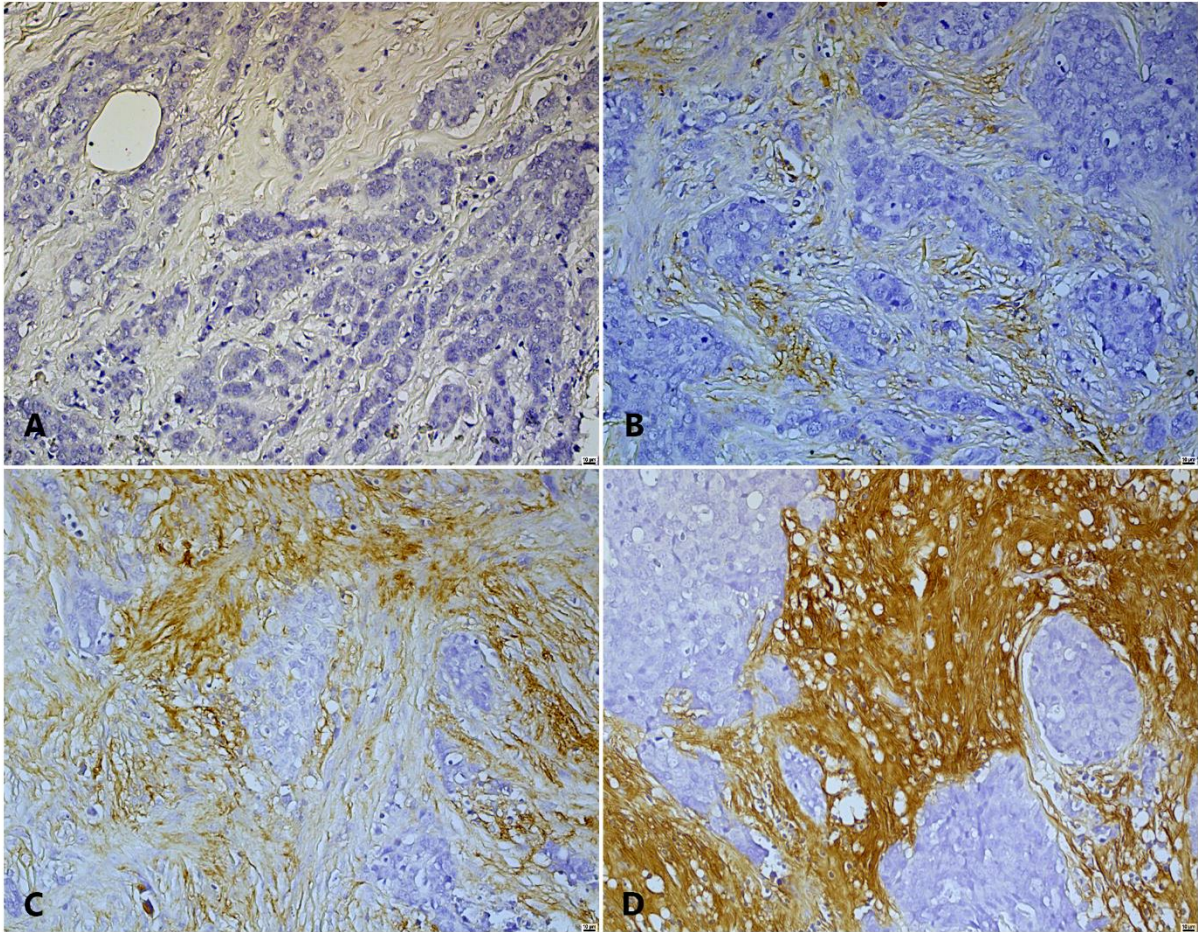
#### 6.5 ANÁLISE DE VERSICAN, VERSIKINA E COMPARAÇÃO ENTRE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS-PATOLÓGICAS GERAIS

A maioria dos pacientes apresentou expressão de versican negativa ou muito fraca (escore 1) ou positivo moderado (escore 3), correspondendo a 22 casos (30,6%), respectivamente (tabela 9). A expressão de versican foi considerada positivo forte (escore 4) em 15 casos (20,8%) (tabela 9) (figura 8). Escore médio de VCAN foi 82,5, sendo que esteve entre 41,25 e 157,5 em 51,4%.

Dentre os casos avaliados, 27,8% dos casos apresentavam intensidade de VKINA positiva fraca e positiva forte respectivamente (figura 9). O escore esteve entre 37,5 e 42,5 em 47,2% dos casos. VKINA não foi avaliada em 7 casos por ausência de tumor na lâmina após realização da imunohistoquímica.

Não foram evidenciadas correlações significantes entre o proteoglicano, seu proteólito e características avaliadas. As tabelas em ANEXOS E e F resumem as correlações observadas na análise bivariada de Spearman entre VCAN, VKINA e as características clínicas e anatomopatológicas. Na comparação entre as categorias de expressão do VCAN, VKINA e as características clínicas e anatomopatológicas não foram identificadas associações significantes (ANEXOS G, H).



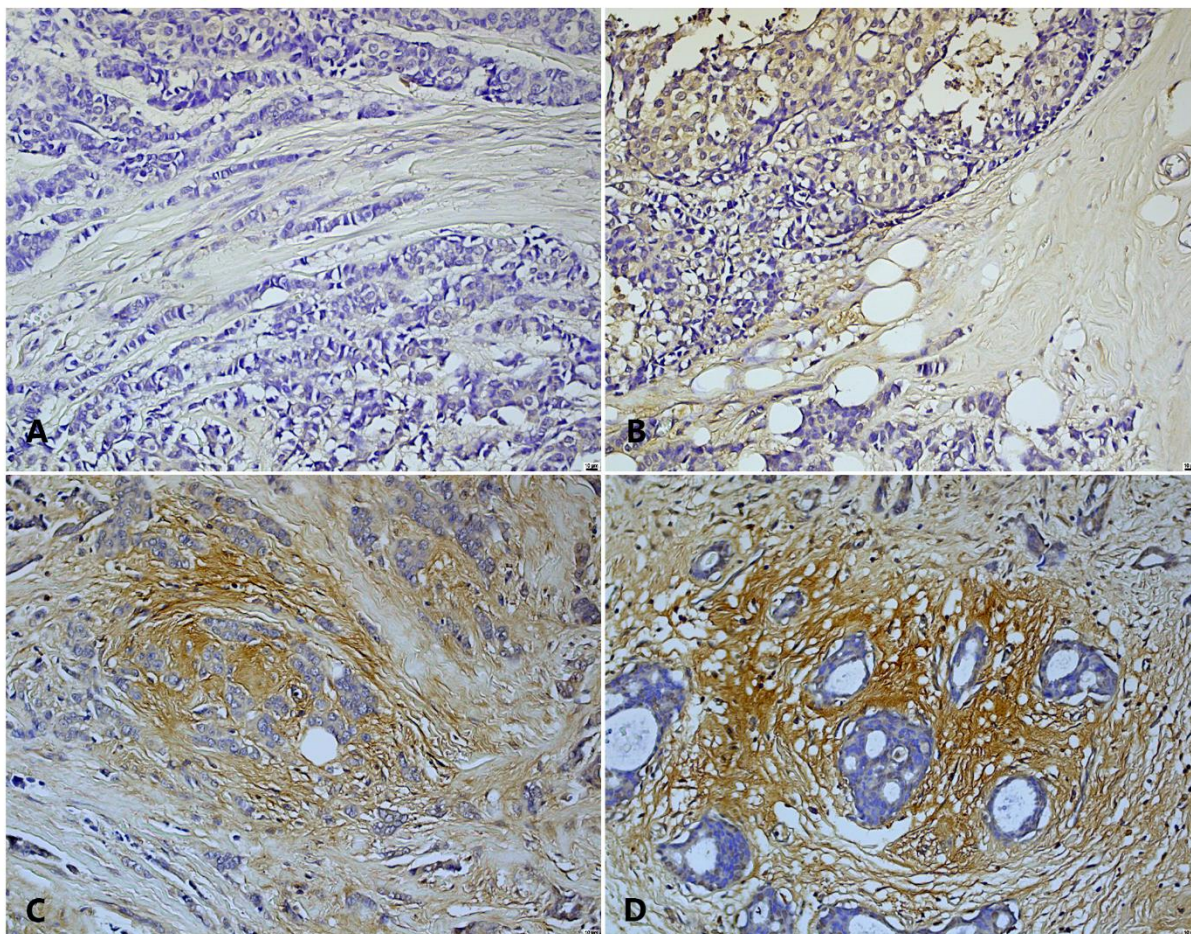


**Legenda:** (A) Imunomarcaco negativa ou positiva muito fraca de versican no estroma adjuvante a clulas do carcinoma invasor. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (B) Imunomarcaco positivo fraco de versican no estroma adjuvante a clulas do carcinoma invasor. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (C) Imunomarcaco positivo moderado de versican no estroma adjuvante a clulas do carcinoma invasor. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (D) Imunomarcaco positivo intenso de versican no estroma adjuvante a clulas do carcinoma invasor. Contra-coloraco com Hematoxilina de Mayer's, 20x.

**Figura 8** - Imunomarcaco de versican nas reas de cncer de mama

**Fonte:** Elaborado pela autora





**Legenda:** (A) Imunomarcção negativa ou positiva muito fraca de versikina no estroma adjuvante a células do carcinoma invasor. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (B) Imunomarcção positivo fraco de versikina no estroma adjuvante a células do carcinoma invasor. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (C) Imunomarcção positivo moderado de versikina no estroma adjuvante a células do carcinoma invasor. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x. (D) Imunomarcção positiva intensa de versikina no estroma adjuvante a células do carcinoma invasor. Contra-coloração com Hematoxilina de Mayer's, 20x.

**Figura 9 - Imunomarcção de versikina nas áreas de câncer de mama.**

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 6.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA NOS SUBTIPOS MOLECULARES

Na análise da expressão de VCAN nos subtipos moleculares, observou-se que os valores de escore foram maiores nos subgrupos tumorais quando comparados ao grupo controle, revelando diferença estatística ( $p = 0,010$ ). Os subtipos luminais e HER-2 apresentaram diferenças estatísticas significativas com relação ao grupo controle ( $p < 0,001$  e  $p = 0,020$ , respectivamente) (tabela 10).

Na análise categorizada do escore de VCAN, foi verificada diferença estatisticamente significativa nas proporções entre os subtipos e o controle ( $p < 0,001$ ). A partir das análises dos resíduos padronizados, observou-se que há diferença significativa nas proporções dos subtipos

moleculares no escore maior ou igual a 157,5 e no escore entre 41,25 e 157,5 quando comparado ao grupo controle. No grupo controle não houve casos de escore maior ou igual 157,5 e no escore entre 41,25 e 157,5. Todos os casos do grupo controle apresentam escore inferior a 41,25 (tabela 10). Também foi observado diferença com significância estatística no percentual de área positiva de VCAN entre o grupo controle e os subtipos moleculares ( $p < 0,001$ ).

A avaliação percentual do VKINA estromal apresentou diferença estatística entre os grupos, sendo que o grupo controle diferiu dos grupos HER2 positivo ( $p = 0,006$ ) e luminal ( $p = 0,002$ ). Na análise comparativa da intensidade de VKINA foi verificada diferença entre os subgrupos avaliados e o grupo controle ( $p < 0,001$ ). A intensidade de marcação negativa ou positiva muito fraca (1) foi em maior proporção no grupo controle (75 %) quando comparado aos grupos triplo-negativo (25%) e HER-2 (15,4%). A intensidade positiva forte foi verificada em maior proporção no grupo triplo-negativo (37,5%) e HER2 (30,8%) e a diferença foi significativa entre os subgrupos avaliados e o grupo controle. Não houve diferença do escore de VKINA nos subtipos moleculares de câncer de mama (tabela 10).

**Tabela 10** - Comparação entre os subtipos moleculares e expressão de VCAN e VKINA

VARIÁVEL	HER2	LUMINAL	TRIPLO	CONTROLE	P-VALOR
	POSITIVO		NEGATIVO		
	MÉDIA ( $\pm$ DP)	MÉDIA ( $\pm$ DP)	MÉDIA ( $\pm$ DP)	MÉDIA ( $\pm$ DP)	
<b>Versican</b>	109,3( $\pm$ 23,4)	117,2 ( $\pm$ 11,9) A	92,8 ( $\pm$ 25,9) AB	18,6 ( $\pm$ 4,3) B	0,001*
<b>escore</b>	A				
Mínimo	0	0	10	0	
Máximo	300	320	280	40	
<b>Versican</b>	48,6 ( $\pm$ 7,4) A	45,2 ( $\pm$ 3,9) A	52,2 ( $\pm$ 12,2) A	5,0 ( $\pm$ 1,1) B	<0,001*
<b>(%)</b>					
Mínimo	0	0	10,0	1,0	
Máximo	90,0	90,0	100	100,0	
<b>Versikina</b>	81,5 ( $\pm$ 14,0)	100,6 ( $\pm$ 10,6)	131,2 ( $\pm$ 36,1)	114,6 ( $\pm$ 11,4)	0,381
<b>escore</b>					
Mínimo	30	10	20	60	
Máximo	200	300	270	200	
<b>Versikina</b>	41,5( $\pm$ 10,6)	45,7( $\pm$ 5,7) A	55,0( $\pm$ 14,3) AB	90,4 ( $\pm$ 4,8) B	0,002*
<b>(%)</b>	A				
Mínimo	10,0	5,0	5,0	60,0	

Máximo	100,0	100,0	100,0	100,0	
<b>VARIÁVEL</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Versican</b>					
<b>intensidade</b>					0,422
1	6 (42,9)	12 (24,5)	4 (44,4)	3 (20,0)	
2	1 (7,1)	10 (20,4)	2 (2,2)	1 (6,7)	
3	5 (35,7)	15 (30,6)	2 (22,2)	4 (26,7)	
4	2 (14,3)	12 (24,5)	1 (11,1)	7 (46,7)	
<b>Versican</b>					<0,001*
<b>Escore</b>					
X < 41,25	4 (28,6) A	10 (20,4) B	2 (22,2) A	15 (100) B	
41,25<=	6 (42,9) A	25 (51,0) A	6 (66,7) A	0B	
X<157,5					
X >= 157,5	4 (28,6) A	14 (28,6) A	1 (11,1) A	0B	
<b>Verskina</b>					
<b>intensidade</b>					< 0,001*
1	2 (15,4) A	3 (6,8) B	2 (25,0) A	9 (75,0) B	
2	3 (23,1) A	17 (38,6) B	0B	2 (16,7) A	
3	4 (30,8)	11 (25,0)	3 (37,5)	1 (8,3)	
4	4 (30,8) A	13 (29,5) A	3 (37,5) A	0B	
<b>Versikina</b>					
<b>Escore</b>					0,315
X < 37,5	2 (15,4)	10 (22,7)	2 (25,0)	0	
37,5<=X<	9 (69,2)	22 (50,0)	3 (37,5)	10 (83,3)	
142,5					
X >= 142,5	2 (15,4)	12 (27,3)	3 (37,5)	2 (16,7)	

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Testes estatísticos: ANOVA seguido do teste de Tukey e Qui-quadrado seguido da avaliação do resíduo ajustado.

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 6.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBTIPOS MOLECULARES E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Na análise comparativa da idade, acometimento de linfonodos e tamanho do tumor não foram observadas diferenças entre os grupos. O Ki67 foi verificado em níveis mais elevados no grupo triplo negativo (58,9%) e essa diferença apresentou significância estatística quando comparado ao grupo luminal ( $p = 0,002$ ) (tabela 11).

Na análise de grau histológico foi verificada diferença com significância estatística entre os subtipos moleculares ( $p = 0,011$ ). Grau 1 apresentou maior proporção no subtipo luminal (22,4%), com diferença significativa entre este e os subtipos triplo negativo e HER2 positivo. Grau 3 foi verificado em maior proporção no triplo negativo (88,9%) seguido pelo HER2 (71,4%) (tabela 11).

**Tabela 11** - Comparação entre os subtipos moleculares e as características clínicas

	<b>HER2 POSITIVO</b>	<b>LUMINAL</b>	<b>TRIPLO NEGATIVO</b>	<b>p-VALOR</b>
<b>Variável</b>	<b>Média (± DP)</b>	<b>Média (± DP)</b>	<b>Média (± DP)</b>	
<b>Linfonodos</b>	0,4 (±0,2)	1,6 (±0,6)	2,7 (±1,6)	0,380
<b>acometidos</b>				
Mínimo	0	0	0	
Máximo	3	25	11	
<b>Tamanho</b>	19,1 (±3,1)	19,5 (±1,1)	20,3 (±31,1)	0,951
<b>do tumor (mm)</b>				
Mínimo	7	6	12	
Máximo	55	45	35	
<b>KI67</b>	42,9 (±4,8) AB	29,4 (±3,2) A	58,9 (±11,9) B	0,002*
Mínimo	20	3	0	
Máximo	80	90	90	
<b>VARIÁVEL</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Status</b>				
<b>de menopausa</b>				
Pré menopausa	2 (14,3)	17 (34,7)	1 (11,1)	0,158
Pós menopausa	12 (85,7)	32 (65,3)	8 (88,9)	



<b>Tamanho do tumor</b>				
T1	10 (71,4)	27 (55,1)	6 (66,7)	0,117
T2	3 (21,4)	22 (44,9)	2 (22,2)	
T3	1 (7,1)	0	1 (11,1)	
<b>Acometimento do linfonodo</b>				
Não	10 (71,4)	33 (67,3)	3 (33,3)	0,120
Sim	4 (28,6)	16 (32,7)	6 (66,7)	
<b>Categoria dos linfonodos</b>				
N0	10 (71,4)	32 (65,3)	3 (33,3)	0,297
N1	3 (21,4)	8 (16,3)	2 (22,2)	
N1mi	1 (7,1)	3 (6,1)	2 (22,2)	
N2	0	3 (6,1)	0	
N3	0	3 (6,1)	2 (22,2)	
<b>Grau histológico final</b>				
1	0A	11 (22,4) B	0A	0,011*
2	4 (28,6)	20 (40,8)	1 (11,1)	
3	10(71,4) A	18 (36,7) B	8 (88,9) C	
<b>TILS categorias</b>				
TILS baixo	6 (42,9) A	39 (79,6) B	4 (44,4) A	0,001*
TILS intermediário	7 (50,0) A	5 (10,2) B	1 (11,1) A	
TILS alto	1 (7,1) A	5 (10,2) A	4 (44,4) B	

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Testes estatísticos: ANOVA seguido do teste de Tukey e Qui-quadrado seguido da avaliação do resíduo ajustado.

**Fonte:** Elaborado pela autora

A análise dos marcadores de linfócitos, a presença de células CD4+ foi maior nos subtipos moleculares quando comparada ao controle revelando diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,021$ ), especialmente entre o grupo HER2 positivo e o controle ( $p = 0,015$ ) (tabela 11). Quanto a infiltração de CD8+ também foi observada maior quantidade de células positivas nos subtipos moleculares quando comparada ao grupo controle ( $p = 0,001$ ). O grupo controle diferiu

dos grupos HER2 positivo ( $p = 0,012$ ), luminal ( $p = 0,001$ ) e triplo negativo ( $p = 0,043$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12** - Comparação da expressão de CD4 e CD8 entre os subtipos moleculares e grupo controle

	<b>HER2 POSITIVO</b>	<b>LUMINAL</b>	<b>TRIPLO NEGATIVO</b>	<b>CONTROLE</b>	<b>p- VALOR</b>
<b>Variável</b>	<b>Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Média (<math>\pm</math> DP)</b>	<b>Média (<math>\pm</math> DP)</b>	
<b>CD4</b>	$5,2 \times 10^{-3}$ ( $\pm 2,0 \times 10^{-3}$ ) A	$0,46 \times 10^{-3}$ ( $\pm 80 \times 10^{-3}$ ) AB	$0,33 \times 10^{-3}$ ( $\pm 1,4 \times 10^{-3}$ ) AB	$0,10 \times 10^{-3}$ ( $\pm 36 \times 10^{-3}$ ) B	0,021*
Minima	0	0	0	0	
Maximo	$0,22 \times 10^{-3}$	$0,26 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$	
<b>CD8+</b>	$2,9 \times 10^{-3}$ ( $\pm 74 \times 10^{-3}$ ) A	$2,9 \times 10^{-3}$ ( $\pm 35 \times 10^{-3}$ ) A	$3,2 \times 10^{-3}$ ( $\pm 42 \times 10^{-3}$ ) A	$0,59 \times 10^{-3}$ ( $\pm 17 \times 10^{-3}$ ) B	0,001*
Minima	0	0	$1,8 \times 10^{-3}$	0	
Maximo	$7,1 \times 10^{-3}$	$8,7 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-3}$	

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Testes estatísticos: ANOVA seguido do teste de Tukey.

**Fonte:** Elaborado pela autora

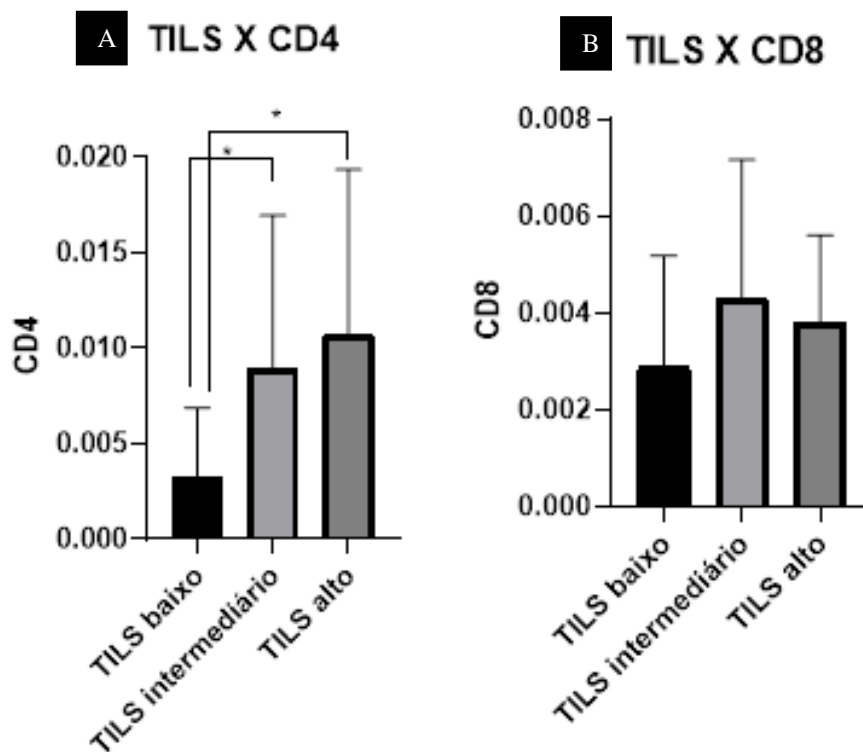
## 6.8 AVALIAÇÃO DE TILS NOS SUBTIPOS MOLECULARES E SUA RELAÇÃO COM EXPRESSÃO DE VERSICAN E VERSIKINA

Não foram evidenciadas correlações significantes entre o proteoglicano, seu proteólito e TILs. As tabelas em ANEXOS E e F resumem as análises das correlações observadas na análise bivariada de Spearman entre VCAN, VKINA e TILS. Na comparação entre as categorias de expressão do VCAN e VKIN e TILs não foram identificadas associações significantes (ANEXOS G, H).

Na análise no TILS conforme categorias descritas na metodologia, foi constatada diferença com significância estatística entre os subgrupos avaliados ( $p = 0,001$ ). TILS baixo foi verificado em maior proporção no subtipo luminal (79,6%) quando comparado aos subtipos triplo negativo (44,4%) e HER2 (42,9%). TILS alto foi constatado em maior proporção do triplo negativo (44,4%) diferindo aos subgrupos HER2 (7,1%) e luminal (10,2%) (Tabela 11).

## 6.9 COMPARAÇÃO DE TILS E EXPRESSÃO DE CD4 E CD8+

O aumento da expressão de TILS esteve associada ao aumento da expressão de CD4 e a diferença entre os grupos apresentou significância estatística. Células CD4+ são menos frequentes no grupo TILS baixo comparado ao grupo TILS intermediário ( $p = 0,004$ ) e TILS alto ( $p = 0,003$ ). Quanto a CD8+, não foi verificada diferença entre os grupos com significância estatística ( $p = 0,137$ ) (Figura 10).



**Teste estatístico:** ANOVA seguido do teste de Tukey

**Legenda:** (A) Avaliação de CD4+ conforme escore de TILs, (B) Avaliação de CD8+ conforme escore de TILs

**Figura 10** - Avaliação de CD4 e CD8+ conforme escore categorizado de TILs

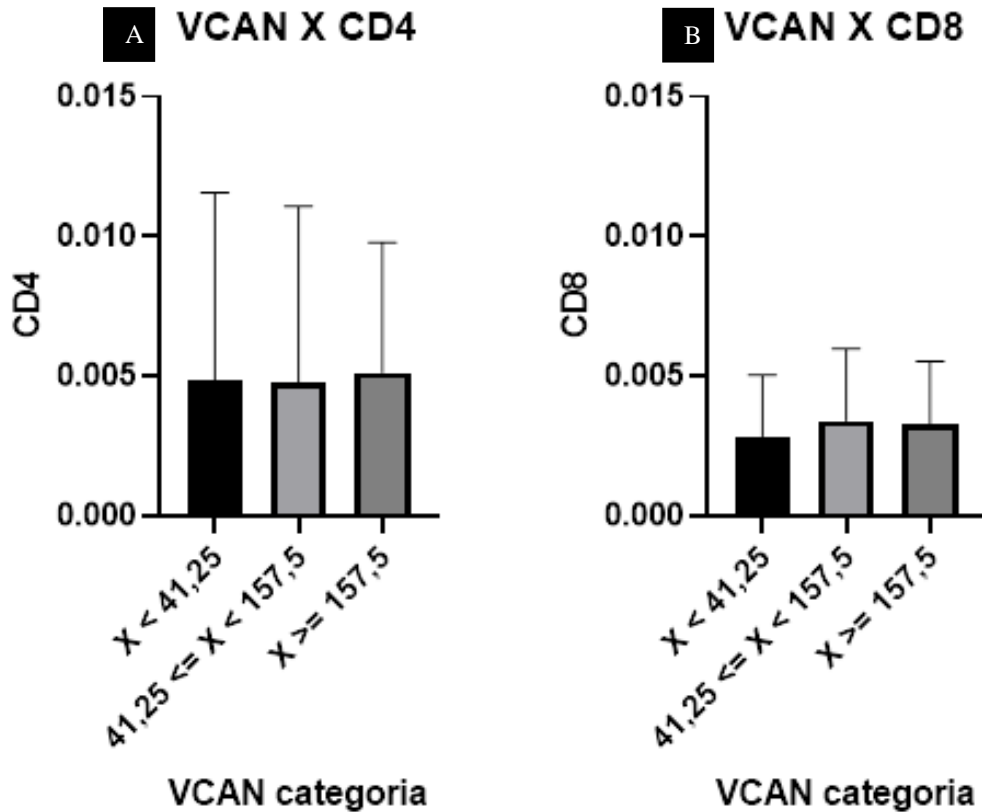
**Fonte:** Elaborado pela autora

## 6.10 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE VERSICAN, VERSIKINA E PRESENÇA DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+

Na comparação entre as categorias de expressão do VCAN e as de CD4+ e CD8+, não foram identificadas associações significantes (ANEXO G) (figura 11).

Verificou-se diferença com significância estatística na expressão de CD8+ entre os escores categorizados de VKINA ( $p = 0,040$ ) (ANEXO G), sendo que o grupo com escore de VKINA superior ou igual a 142,5 diferiu daquele inferior entre 37,5 e 142,5 ( $p = 0,041$ ),

evidenciados pelo pós-teste de Tukey (Figura 12). A expressão de CD4 aumentou com o aumento do escore de VKINA, mas essa diferença não apresentou significância estatística ( $p = 0,439$ ) (Figura 12).

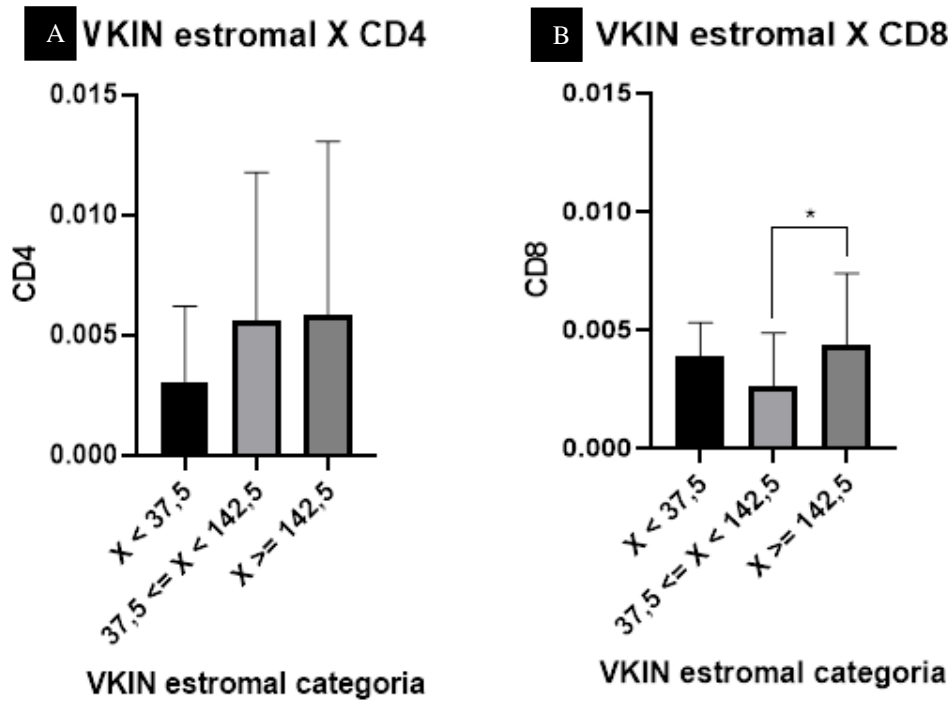


**Teste estatístico:** ANOVA

**Legenda:** (A) Avaliação de CD4+ conforme escore de VCAN. (B) Avaliação de CD8+ conforme escore de VCAN.

**Figura 11 - Avaliação de CD4 e CD8+ conforme escore categorizado de versican.**

**Fonte:** Elaborado pela autora



**Teste estatístico:** ANOVA seguindo do teste de Tukey

**Legenda:** (A) Avaliação de CD4+ conforme escore de VKIN. (B) Avaliação de CD8+ conforme escore de VKIN.

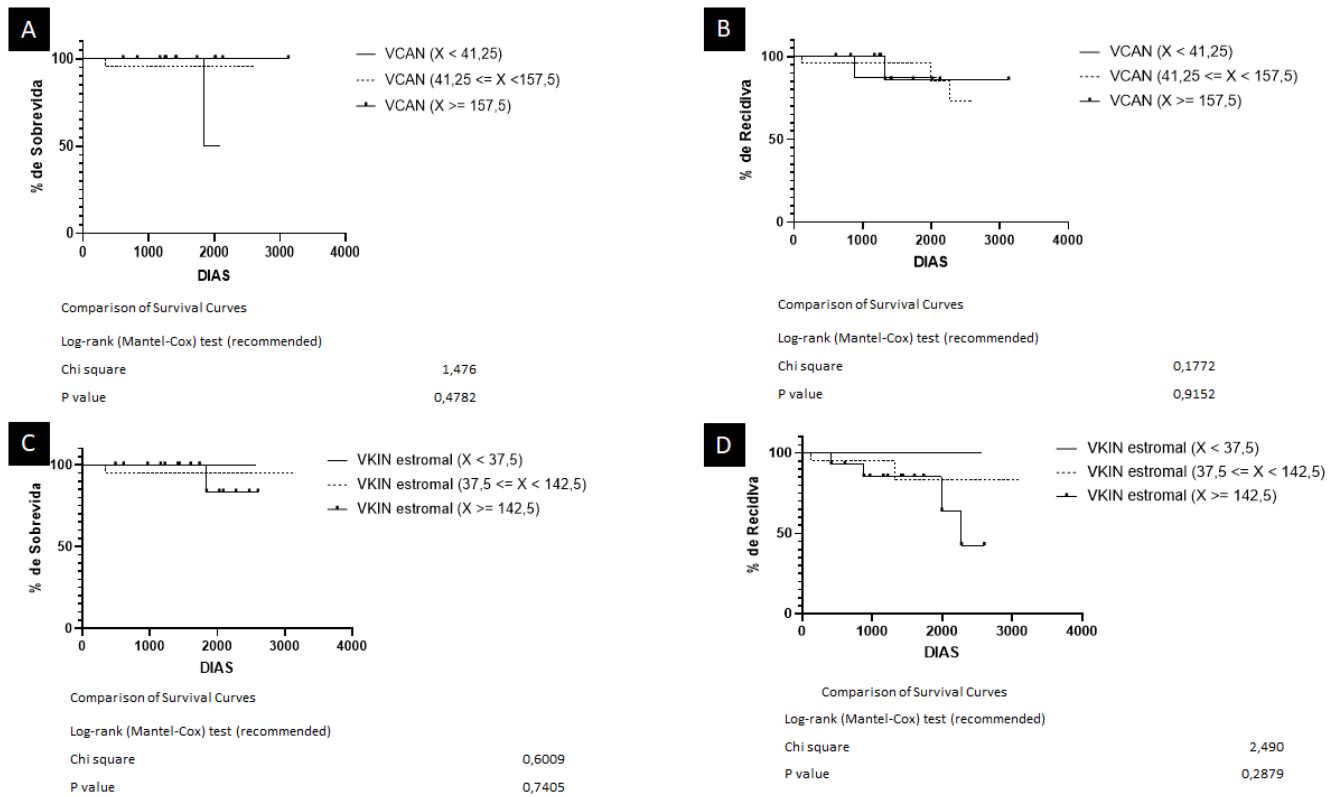
**Figura 12** - Avaliação de CD4 e CD8+ conforme escore categorizado de versikina

**Fonte:** Elaborado pela autora

### 6.11 AVALIAÇÃO DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE RECORRÊNCIA CONFORME EXPRESSÃO CATEGORIZADA DO ESCORE DE VERSICAN E VERSIKINA

Na avaliação do tempo de sobrevida global das pacientes não foram observadas diferenças significativas conforme as categorias de VCAN ( $p = 0,478$ ) e de VKINA ( $p = 0,740$ ) (figura 13).

Ao avaliar a sobrevida livre de recorrência, as categorias de VCAN ( $p = 0,287$ ) bem como de VKINA não revelaram diferenças significativas entre os grupos ( $p = 0,915$ ) (figura 13).



**Legenda:** (A) Sobrevida global entre os escores de VCAN. (B) Sobrevida livre de recorrência entre os escores de VCAN. (C) Sobrevida global entre os escores de VKIN. (D) Sobrevida livre de recorrência entre os escores de VKIN.

**Figura 13** - Avaliação da sobrevida global e sobrevida livre de recorrência conforme categoriais de versican e versikina.

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, a média de idade das pacientes foi de 59 anos e a maioria das pacientes apresentava idade maior ou igual a 65 anos. Conforme dados da literatura, a idade média de idade para diagnóstico de câncer é 63 anos e há aumento do risco de câncer de mama com a idade, de modo que é 2,4% na faixa etária de 50-59 anos e 7% nas mulheres com 70 anos ou mais. Foi demonstrado também que negros são diagnosticados com idade inferior (60 anos) (SEER, 2019). A diferença de idade encontrada no estudo quando comparada a literatura internacional deve-se as diferenças socioeconômicas e diferenças étnico-raciais.

O estadiamento I foi o mais frequente (48,6%). Conforme registros do banco de dados de Vigilância, Epidemiologia e Resultados (SEER), 64% das mulheres são diagnosticadas com doença limitada a mama (SEER, 2019). No Brasil, por sua vez, os dados são escassos. O estudo AMAZONA é a maior coorte retrospectiva realizada no país e incluiu 2950 mulheres com câncer de mama com estágio I - III no período de 2001 e 2006. No diagnóstico, 23,3% foram diagnosticados no estágio I, 53,5% no estágio II e 23,2% no estágio III. Esses dados demonstram a diferença nas proporções entre os estadiamentos em cada país, o que pode refletir diferentes padrões biológicos, socioeconômicos e de acesso ao sistema de saúde. A maior proporção de pacientes em estágio I no presente estudo quando comparada àquela do estudo brasileiro pode estar relacionada a inclusão apenas de pacientes da rede privada. No estudo Amazona, a maioria das pacientes incluída foi atendida no sistema único de saúde (80,8%) (SIMON et al., 2019).

O subtipo molecular luminal B foi o mais frequente. EROLES et al. (2012) demonstrou que o subtipo de maior frequência é o luminal A, correspondendo a 50-60% dos casos; o subtipo luminal B, por sua vez, corresponde a 10 – 20% dos casos. Dados brasileiros demonstraram que o subtipo luminal A corresponde a quase metade dos casos de câncer de mama no país, enquanto que o luminal B corresponde a 8,7% dos casos (SIMON et al., 2019). Essa diferença no presente estudo quando comparado a literatura deve-se a amostragem por conveniência.

VCAN foi verificado em maior expressão no câncer de mama quando comparado com o tecido normal e essa diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos controle versus luminal e HER2. A expressão de VCAN no tecido normal foi baixa e não foi verificada expressão elevada (maior ou igual a 157,5) ou intermediária ( $41,25 \leq x < 157,7$ ) em nenhum espécime. KHARAIHVILI et al. (2011) avaliou a expressão de VCAN por imunohistoquímica em 173 espécimes de câncer de mama. A expressão de VCAN foi maior no câncer de mama quando comparada ao tecido normal e lesões precursoras, sendo que foi superexpresso

no subtipo luminal em comparação com HER2 e triplo negativo ( $p 0,012$ ). Esse dado corrobora o papel do VCAN nas etapas da proliferação, diferenciação, adesão celular, migração e apoptose (ASANO et al., 2017; DU et al., 2010; HIRANI et al., 2021). No entanto, no presente estudo, não foi identificada diferença entre os subtipos moleculares, ao contrário do que foi observado por KHARAISHVILI et al. (2011). Isto pode ser explicado pela diferença na metodologia empregada no que tange a classificação de intensidade e escore.

O percentual de área positiva de VCAN também foi verificada em maior proporção nos subtipos moleculares quando comparada ao controle. Não há dados na literatura para comparação, mas ratifica o papel do VCAN na carcinogênese e sugere que não haja diferença de expressão entre os subtipos de câncer de mama (ASANO et al., 2017).

Não foi verificada associação dos escores de VCAN com as características clínicas e patológicas. SUWIWAT et al. (2004) realizou avaliação de versican e outros componentes da matriz extracelular em 86 pacientes com câncer de mama linfonodo negativo através da determinação da área imunomarcada na imuno-histoquímica (em pixels) e absorvância (ou seja, densidade óptica). Não foi encontrada relação entre o nível de coloração do VCAN do estroma e fator clínico-patológico (tamanho do tumor, estadiamento, grau histológico), exceto pelo status do receptor de progesterona ( $p 0,015$ ). Esse dado sugere que o VCAN, apesar de superexpresso no câncer de mama, parece não interferir nas características prognósticas (clínicas e patológicas). Não foi encontrado nesse estudo diferença entre VCAN e a expressão do receptor de progesterona, no entanto, foram utilizados padrões de classificação de VCAN distintos e isto pode ter influenciado nos resultados.

Não foi identificada nesse estudo diferença de escore de VKINA entre os grupos. No entanto, a intensidade da expressão de VKINA diferiu entre os grupos avaliados; a intensidade positiva forte não foi verificada no grupo controle e diferiu significativamente quando comparada aos subtipos moleculares. Não há dados na literatura sobre a expressão de VKINA em câncer de mama, mas sugere-se que este proteólito esteja presente nos processos de progressão tumoral ou que a intensidade da expressão seja de maior relevância ao mecanismo de carcinogênese que a extensão de área positivamente marcada.

Não foi identificada correlação entre outros fatores clínicos e escore de VKINA. Não há dados na literatura para comparação com esse resultado. Quanto aos dados patológicos, a expressão de CD8+ apresentou diferença estatisticamente significativa entre os escores de VKINA, sendo que escore elevado (maior ou igual 142,5) diferiu significativamente daquele com escore intermediário ( $37,5 \leq \text{VKINA} < 142,5$ ). Foi verificado maior expressão de CD8+ naqueles com elevada escore de VKINA. A expressão de CD4 aumentou progressivamente



conforme o escore de VKINA, no entanto, sem significância entre os grupos. Até o presente momento, não há dados em câncer de mama sobre o papel do VKINA no recrutamento de células imunes, contudo tem sido estudado no câncer de cólon e mieloma múltiplo. No câncer colorretal, o aumento dos níveis de VKINA e baixos níveis de VCAN esteve associado a infiltração robusta de células T CD8+ e a mobilização de células dendríticas (HOPE et al., 2017). No mieloma múltiplo, HOPE et al. (2016) demonstrou que intensa proteólise de VCAN por secreção de ADAMTS1 por macrófagos estromais esteve associada a infiltração por células T CD8+ e expressão precoce de citocinas inflamatórias  $1\beta$  e IL-6. Acredita-se que a proteólise do VCAN esteja associada indução da transcrição de interferon tipo 1, dependente de IRF8 e IL2 e consequente maturação de células dendríticas. Essas são necessárias para a fase efetora da célula T antitumoral, orquestrando redes de quimiocinas que induzem a infiltração de CD8+ - prevê-se que essas ações aumentem a imunogenicidade e a “detecção” do tumor pelo sistema imune (SPRANGER et al., 2017; HOPE et al., 2017; PAPADAS et al., 2022). Esse dado corrobora com o papel imunomodulador do VKINA e dados adicionais são necessários para a melhor definição do papel do proteólito no câncer de mama.

Apesar da relação entre VKINA e linfócitos ter sido retratada em outros tipos tumorais, não foi encontrada correlação entre a expressão de VKINA e TILs no presente trabalho. Em concordância com dados da literatura, TILs alto foi verificado em maior proporção em pacientes com doença triplo negativo e HER2; nesses subtipos, o TILs tem sido associado a um aumento de pCR, maior sobrevida livre de doença e sobrevida global, independente de outros fatores (COATES et al., 2015).

Neste estudo, foi avaliado a expressão de CD4 e CD8+ nas categoriais de TILs. Na avaliação da expressão de CD4, foi visto diferença significativa entre os grupos, com aumento da expressão de CD4 à medida que houve aumento do TILs. Não houve diferença entre as categoriais de TILs na análise de expressão de CD8+. É conhecido a correlação deste fenótipo do infiltrado com o prognóstico. A extensa infiltração tumoral por células T CD8+ citotóxicas está fortemente associada a sobrevida e a resposta terapêutica. As células T reguladoras CD4 apresentam papel ambíguo; as células Th1 estão associadas a resultados clínicos favoráveis, enquanto que as células Th2 estão associadas a redução da atividade anti-tumoral (SALGADO et al., 2015).

Os níveis de VCAN não foram associados a impacto em sobrevida global ou sobrevida livre de recorrência. No entanto, essa análise foi limitada pelo número reduzido de eventos (óbitos e recorrência) na população avaliada. Na literatura, é evidenciado associação da expressão de VCAN com recidiva de doença. RICCIARDELLI et al (2002) avaliou a expressão

de VCAN em 58 pacientes com câncer de mama sem acometimento linfonodal e sugeriu que o nível de VCAN peritumoral era preditor de sobrevida livre de recidiva. Níveis elevados de VCAN esteve associada a menor sobrevida livre de recorrência (33% versus 83%,  $p = 0,006$ ). Nesse estudo, a expressão de versican foi realizada por quimioluminescência e imunoblotting, o que limita a comparação com o presente trabalho. SUWIWAT et al. (2004) avaliou a expressão de VCAN por meio da imuno-histoquímica e verificou que o aumento da expressão de VCAN prediz maior taxa de recidiva, independentemente do tamanho do tumor (>75% em 5 anos). Novos estudos são necessários para avaliar o impacto de VCAN em prognóstico, visto que a literatura disponível é escassa e utiliza metodologias para avaliação da expressão de VCAN não utilizadas nos estudos atuais.

A expressão de VKINA também não foi correlacionada com prognóstico. Não há dados sobre a correlação de desfechos oncológicos em câncer de mama e expressão de VKINA.

Neste estudo também foi avaliado as características clínico-patológicas dos subtipos moleculares. Tumores triplo negativo apresentavam maior Ki67, maior grau histológico e maior TILs comparados àqueles luminais. Esses dados são corroborados pela literatura (ZHAO et al., 2020; BERNARD et al., 2009).

Contudo, este estudo apresenta vieses relacionados ao tamanho da amostra analisada, ao caráter retrospectivo da coleta de dados e o uso de material parafinado que pode comprometer as análises de imuno-histoquímica. Apesar disso, permite dados importantes para melhor entendimento do papel do VCAN e VKINA na carcinogênese, agregando dados frente a literatura escassa sobre o tema e gerando hipóteses para estudos posteriores.

## 8 CONCLUSÃO

A expressão de VCAN foi maior em amostras de câncer de mama, independente do tipo molecular, quando comparadas às amostras controles. Os subtipos luminais e aqueles com hiperexpressão de HER-2 apresentaram diferenças estatísticas significativas com relação ao grupo controle. Este resultado reforça o papel deste proteoglicano na carcinogênese. No entanto, a expressão desse proteoglicano não apresentou associação com fatores clínicos e patológicos, assim como, não foi associado a impacto em sobrevida global ou sobrevida livre de recorrência. Esses dados sugerem que VCAN pode não ser um marcador prognóstico, no entanto, estudos adicionais e dados com seguimento longo são necessários para definição desse papel.

Não foi identificado nesse estudo diferença de escore de VKINA entre os grupos. No entanto, a intensidade da expressão de VKINA diferiu entre os grupos avaliados; a intensidade positiva forte não foi verificada no grupo controle e diferiu significativamente quando comparada aos subtipos moleculares. Esse dado sugere que VKINA é expressa em tecidos normais e no câncer, mas que a intensidade da marcação é maior no tecido tumoral e isto pode apresentar correlação com etapas no desenvolvimento e progressão tumoral.

A expressão de VKIN apresentou correlação com expressão de CD8+, o que pode corroborar com seu papel na regulação imune. Não foi verificada associação com outros fatores clínicos e patológicos e com sobrevida global ou sobrevida livre de recorrência, o que pode sugerir que VKIN não seja um marcador prognóstico.

## REFERÊNCIAS

AMIN, M.B; EDGE, S.B; GREENE, F.L. No Title. **American Joint Committee on Cancer Cancer Staging Manual**, [S. l.], v. 3, n. 8, 2018.

AMMOURI, A H.; HAMADE, R. F. **So Se**. [s.l: s.n.]. v. 57

ASANO, K. et al. Stromal Versican Regulates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-17613-6.

AZIM, H. A.; GHOSN, M.; OUALLA, K.; KASSEM, L.. Personalized treatment in metastatic triple-negative breast cancer: The outlook in 2020. **Breast Journal**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 69–80, 2020. DOI: 10.1111/tbj.13713.

BAIRI, K. El et al. The tale of TILs in breast cancer : A report from The International Immunology Biomarker Working Group. **npj Breast Cancer**, [S. l.], v. 7, n. 150, 2021.

BANDYOPADHYAY, S.; BLUTH, M. H.; ALI-FEHMI, R. Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling 2018. **Clinics in Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 401–420, 2018. DOI: 10.1016/j.cll.2018.02.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2018.02.006>.

BARTLETT, J. M. S. et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: A prospectively powered pathology study in the tamoxifen and exemestane adjuvant multinational trial. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 29, n. 12, p. 1531–1538, 2011. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.3677.

BINDER, M. J. et al. Alister C. The extracellular matrix in cancer progression: Role of hyalectan proteoglycans and ADAMTS enzymes. **Cancer Lett.**, [S. l.], v. 28, n. 385, p. 55–64, 2017.

BORROS, A. Tumor microenvironment. **Medicina**, [S. l.], n. 4, 2019. DOI: 10.1002/jcb.21320.

CHIEN, A. Jo et al. original reports abstract MK-2206 and Standard Neoadjuvant Chemotherapy Improves Response in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – Positive and / or Hormone Receptor – Negative Breast Cancers in the I-SPY 2 Trial. [S. l.], v. 38, n. 10, 2020.

COATES, A. S. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1533–1546, 2015. DOI: 10.1093/annonc/mdv221.

CORTES, J. et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. **The Lancet**, [S. l.], v. 396, n. 10265, p. 1817–1828, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32531-9.

CSERNI, G.. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. **Pathologica**, [S. l.], v. 112, n. 1, p. 25–41, 2020. DOI: 10.32074/1591-951X-1-20.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 2007. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603756.

DE JONG, V. M. T. et al. 1590 Prognostic value of tumour infiltrating lymphocytes in young triple negative breast cancer patients who did not receive adjuvant systemic treatment; by the PARADIGM study group. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 31, p. S303, 2020. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.281.

DENKERT, C. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 40–50, 2018. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X.

DIECI, M. V. et al. Association of tumor-infiltrating lymphocytes with distant disease-free survival in the ShortHER randomized adjuvant trial for patients with early HER2-2+breast cancer. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 418–423, 2019. DOI: 10.1093/annonc/mdz007.

DU, W. W. et al. Versican G3 domain modulates breast cancer cell apoptosis: A mechanism for breast cancer cell response to chemotherapy and egfr therapy. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 11, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0026396.

DU, W. W. et al. The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 443–455, 2013. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0461.

DU, W. W. et al. G3 Promotes Mouse Mammary Tumor Cell Growth, Migration, and Metastasis by Influencing EGF Receptor Signaling. **Plos One**, [S. l.], v. 5, n. 11, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0013828.

EAKER, S. et al. Differences in management of older women influence breast cancer survival: Results from a population-based database in Sweden. **PLoS Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 321–328, 2006. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030025.

EHINGER, A. et al. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. **Acta Oncologica**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 68–74, 2017. DOI: 10.1080/0284186X.2016.1237778.

EXPECTANCY, L.; RADICAL, F.; CARCINOMA, F. O. R.; THE, O. F.; CLINICAL, A. for Carcinoma of the Breast : a Clinical and Pathologic Study of 218 Cases \*. [S. l.], p. 61–69, [s.d.].

FREDHOLM, H.; EAKER, S.; FRISSELL, J.; HOLMBERG, L.; FREDRIKSSON, I.; LINDMAN, Henrik. Breast cancer in young women: Poor survival despite intensive treatment. **Plos One**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. 1–9, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007695.

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

10.1093/annonc/mdt303.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: Highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011. DOI: 10.1093/annonc/mdr304.

GONZALEZ-ANGULO, A. M. et al. High risk of recurrence for patients with breast cancer who have human epidermal growth factor receptor 2-positive, node-negative tumors 1 cm or smaller. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 34, p. 5700–5706, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.2025.

GONZALEZ-ERICSSON, P. I. et al. The path to a better biomarker: application of a risk management framework for the implementation of PD-L1 and TILs as immuno-oncology biomarkers in breast cancer clinical trials and daily practice. **Journal of Pathology**, [S. l.], v. 250, n. 5, p. 667–684, 2020. DOI: 10.1002/path.5406.

HOPE, C. et al. Versican-derived matrikines regulate Batf3-dendritic cell differentiation and promote T-cell infiltration in colorectal cancer. **J Immunol**, [S. l.], v. 199, n. 5, p. 1933–1941, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1700529.Versican-derived.

HUANG, J. et al. Extracellular matrix and its therapeutic potential for cancer treatment. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00544-0.

HUANG, M. et al. Association of pathologic complete response with long-term survival outcomes in triple-negative breast cancer: A meta-analysis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 80, n. 24, p. 5427–5434, 2020. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1792.

INTERNATIONAL TILS WORKING GROUP - BCRF - Breast Cancer Research Foundation.  
Disponível em: : <https://www.tilsinbreastcancer.org/>

KEENAN, T. et al. Comparison of the genomic landscape between primary breast cancer in African American versus white women and the association of racial differences with tumor recurrence. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 33, n. 31, p. 3621–3627, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.2126.

KELWICK, R. et al. The adamts: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. **Genome Biology**, [S. l.], v. 16, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s13059-015-0676-3.

KENAGY, R. D.; PLAAS, A. H.; WIGHT, Thomas N. Versican Degradation and Vascular Disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 209–215, 2006. DOI: 10.1016/j.tcm.2006.03.011.

KISCHEL, P. et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 126, n. 3, p. 640–650, 2010. DOI: 10.1002/ijc.24812.

LIOTTA L; K. E. The microenvironment of the tumour-host interface. **Nature**, [S. l.], v. 411, p. 375–379, 2001. Disponível em:

<https://www.nature.com/nature/journal/v411/n6835/pdf/411375a0.pdf>.

LOI, S. et al. The journey of tumor-infiltrating lymphocytes as a biomarker in breast cancer: clinical utility in an era of checkpoint inhibition. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 32, n. 10, p. 1236–1244, 2021. DOI: 10.1016/j.annonc.2021.07.007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.07.007>.

LOI, S. et al. A. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis : A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers abstract. [S. l.], v. 37, n. 7, p. 559–570, 2019.

LOI, S. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis : A Pooled Individual Patient Analysis of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancers abstract. [S. l.], v. 37, n. 7, p. 559–570, 2022.

LOIBL, S. et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: Clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 30, n. 8, p. 1279–1288, 2019. DOI: 10.1093/annonc/mdz158.

MITTAL, S.; BROWN, N. J. ; HOLEN, I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 227–243, 2018. DOI: 10.1080/14737159.2018.1439382. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1439382>.

MIYASHITA, M. et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: A retrospective multicenter study. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–13, 2015. DOI: 10.1186/s13058-015-0632-x.

NAJAFI, M.; FARHOOD, B.; MORTEZAEI, K.. Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 120, n. 3, p. 2782–2790, 2019. DOI: 10.1002/jcb.27681.

OKCU, O; ÖZTÜRK, S. D.; ÖZTÜRK, Ç.; ŞEN, B.; YASIN, A. İ.; BEDİR, R. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs)/volume and prognosis: The value of TILs for survival in HER-2 and TN breast cancer patients treated with chemotherapy. **Annals of Diagnostic Pathology**, [S. l.], v. 58, n. 74, 2022. DOI: 10.1016/j.andiagpath.2022.151930.

PAPADAS, A. et al. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [S. l.], v. 68, n. 12, p. 871–885, 2020. DOI: 10.1369/0022155420937098.

PARK, J. H. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with early-stage triple-negative breast cancers (TNBC) who did not receive adjuvant chemotherapy. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 30, n. 12, p. 1941–1949, 2019. DOI: 10.1093/annonc/mdz395.

PURDIE, C. A. et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: A population-based study. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 565–572, 2014. DOI: 10.1038/bjc.2013.756.

RAKHA, E. A. et al. Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 26, n. 19, p. 3153–3158, 2008. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.5986.

RICCIARDELLI, C. et al. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. **Clin Cancer Res.**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 1054–1060, 2002.

SALGADO, R. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER-2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. **JAMA oncology**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 448–454, 2015. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.0830.Tumor-Infiltrating.

SALGADO, R. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: Recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 259–271, 2015. DOI: 10.1093/annonc/mdu450.

SAVAS, P. et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: From TILs to the clinic. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 228–241, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.215. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.215>.

SCHNEIDER, I. J. C.; D'ORSI, E. Sobrevida em cinco anos e fatores prognósticos em mulheres com câncer de mama em Santa Catarina, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1285–1296, 2009. DOI: 10.1590/s0102-311x2009000600011.

SEER Cancer Stat Fatos: Câncer de Mama Feminino. Instituto Nacional do Câncer. Bethesda, MD. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>

SENDA, M.; FUKUYAMA, R.; NAGASAKA, T.. Kinetics of versican-expressing macrophages in bone marrow after cord blood stem cell transplantation for treatment of acute myelogenous leukaemia. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 69, n. 10, p. 906–911, 2016. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203496.

BARRIOS, C. H. et al. What is the role of chemotherapy in estrogen receptor-positive, advanced breast cancer? **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 1157–1162, 2009. DOI: 10.1093/annonc/mdn756.

BERNARD, Philip S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 8, p. 1160–1167, 2009. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1370.

BIANCHINI, Giampolo et al. TNBC: challenges and opportunities of a heterogenous disease. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 674–690, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.66.Triple-negative.

BODE-LESNIEWSKA, Beata et al. Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 303–312, 1996. DOI: 10.1177/44.4.8601689.



COATES, Alan S. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1533–1546, 2015. DOI: 10.1093/annonc/mdv221.

COLLEONI, Marco et al. Annual hazard rates of recurrence for breast cancer during 24 years of follow-up: Results from the international breast cancer study group trials I to V. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 34, n. 9, p. 927–935, 2016. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.3504.

DU, William Weidong et al. Versican G3 Promotes Mouse Mammary Tumor Cell Growth, Migration, and Metastasis by Influencing EGF Receptor Signaling. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 5, n. 11, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0013828.

EROLE, Pilar et al. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>.

EVANKO, S. P. et al. Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 394, n. 1, p. 29–38, 2001. DOI: 10.1006/abbi.2001.2507.

FOULKES, William D. et al. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 117, n. 1, p. 199–204, 2009. DOI: 10.1007/s10549-008-0102-6.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 24, n. 9, p. 2206–2223, 2013. DOI: 10.1093/annonc/mdt303.

HIRANI, Priyanka et al. Targeting Versican as a Potential Immunotherapeutic Strategy in the Treatment of Cancer. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 11, n. August, p. 1–12, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.712807.

HOPE, CHELSEA et al. Versican-derived matrikines regulate Batf3-dendritic cell differentiation and promote T-cell infiltration in colorectal cancer. **J Immunol**, [S. l.], v. 199, n. 5, p. 1933–1941, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1700529. Versican-derived.

HOPE, CHELSEA et al. Immunoregulatory roles of versican proteolysis in the myeloma microenvironment. **Blood**, [S. l.], v. 128, n. 5, p. 680–5, 2016.

JIANG, Yi Zhou et al. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 428–440.e5, 2019. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.02.001.

JING YAN. et al. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in the Precision Medicine Era. **Methods Mol Biol**, [S. l.], n. 2204, p. 53–61, 2020.

KHARAISHVILI, Gvantsa et al. Collagen triple helix repeat containing 1 protein, periostin and versican in primary and metastatic breast cancer: An immunohistochemical study. **Journal of**

**Clinical Pathology**, [S. l.], v. 64, n. 11, p. 977–982, 2011. DOI: 10.1136/jclinpath-2011-200106.

KILLELEA, Brigid K. et al. Racial differences in the use and outcome of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: Results From the National Cancer Data Base. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 33, n. 36, p. 4267–4275, 2015. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.7801.

KISCHEL, Philippe et al. Versican overexpression in human breast cancer lesions: Known and new isoforms for stromal tumor targeting. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 126, n. 3, p. 640–650, 2010. DOI: 10.1002/ijc.24812.

LAPIERRE, David P. et al. The ability of versican to simultaneously cause apoptotic resistance and sensitivity. **Cancer Research**, [S. l.], v. 67, n. 10, p. 4742–4750, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3610.

LI, Yunhai et al. Clinicopathological Characteristics and Breast Cancer-Specific Survival of Patients With Single Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. **JAMA network open**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. e1918160, 2020. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2019.18160.

PAPADAS, Athanasios et al. Stromal remodeling regulates dendritic cell abundance and activity in the tumor microenvironment. **Cell Reports**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 1–49, 2022. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111201.

PAPADAS, Athanasios et al. Versican and Versican-matrikines in Cancer Progression, Inflammation, and Immunity. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [S. l.], v. 68, n. 12, p. 871–885, 2020. DOI: 10.1369/0022155420937098.

PASSARELLI, Michael N. et al. Cigarette smoking before and after breast cancer diagnosis: Mortality from breast cancer and smoking-related diseases. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 1315–1322, 2016. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.9328.

PINDER, SE et al. Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. III. Vascular invasion: relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. **Histopathology.**, [S. l.], v. 1, 1994.

RICCIARDELLI, CARMELA et al. Regulation of stromal versican expression by breast cancer cells and importance to relapse-free survival in patients with node-negative primary breast cancer. **Clin Cancer Res.**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 1054–1060, 2002.

SALGADO, R. et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILS) in breast cancer: Recommendations by an International TILS Working Group 2014. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 259–271, 2015. DOI: 10.1093/annonc/mdu450.

SANDRA M. SWAIN et al. Longer Therapy, Iatrogenic Amenorrhea, and Survival in Early Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 362, n. 22, 2010.

SIEGEL RL, MILLER KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer J Clin.**, [S. l.], v. 67, n. 1, 2017.

SIMON, Sergio Daniel et al. Characteristics and prognosis of stage I-III breast cancer subtypes

in Brazil: The AMAZONA retrospective cohort study. **Breast**, [S. l.], v. 44, p. 113–119, 2019. DOI: 10.1016/j.breast.2019.01.008.

SKANDALIS, Spyros S. et al. Versican but not decorin accumulation is related to malignancy in mammographically detected high density and malignant-appearing microcalcifications in non-palpable breast carcinomas. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 314, 2011. DOI: 10.1186/1471-2407-11-314. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/314>.

SOCOVICH, Alexandra M.; NABA, Alexandra. The cancer matrisome: From comprehensive characterization to biomarker discovery. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 89, p. 157–166, 2019. DOI: 10.1016/j.semcd.2018.06.005.

STEFANI SPRANGER, DAISY DAI, BRENDAN HORTON, Thomas Gajewski. Tumor-residing Batf3 dendritic cells are required for effector T cell trafficking and adoptive T cell therapy Stefani. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 711–723, 2017. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.04.003. Tumor-residing.

SUWIWAT, Supaporn et al. Expression of Extracellular Matrix Components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin, and Hyaluronan, and Their Association with Disease Outcome in Node-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 2491–2498, 2004. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0146.

TAN, Zhenya et al. Mapping Breast Cancer Microenvironment Through Single-Cell Omics. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 13, n. April, p. 1–10, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.868813.

TSIDULKO, Alexandra Y. et al. Proteoglycan expression correlates with the phenotype of malignant and non-malignant EBV-positive B-cell lines. **Oncotarget**, [S. l.], v. 6, n. 41, p. 43529–43539, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.5984.

ZHAO, Shen; ZUO, Wen-Jia; SHAO, Zhi-Ming; JIANG, Yi-Zhou. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. **Annals of Translational Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 499–499, 2020. DOI: 10.21037/atm.2020.03.194.

ZHENG, Peng Sheng et al. Versican/PG-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 754–756, 2004. DOI: 10.1096/fj.03-0545fje.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, [S. l.], v. 82, n. 3–4, p. 142–152, 2015. DOI: 10.1159/000430499.

STANTON, S. E.; ADAMS, S.; DISIS, M. L. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. **JAMA oncology**, [S. l.], v. 2, n. 10, p. 1354–1360, 2016. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.1061.

STANTON, S. E.; DISIS, M. L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1186/s40425-016-0165-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>.

SUWIWAT, S. et al. Expression of Extracellular Matrix Components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin, and Hyaluronan, and Their Association with Disease Outcome in Node-Negative Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 2491–2498, 2004. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0146.

TAVARES, M. C. **Caracterização do infiltrado inflamatório e associação com expressão proteica de pd-1 , pd-l1 e pd-l2 e sobrevida em carcinoma mamário triplo-negativo**. [S. l.], 2018.

VINGIANI, C. C. A et al.. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ER+/ HER-2– breast cancer. [S. l.], n. 0123456789, 2020.

WHO Classification of Tomours Editorial Board. Breast tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2019. (WHO classification of tumours series, 5<sup>th</sup> ed.; vol 2). <https://publications.iarc.fr/581>

WORLD CANCER RESEARCH FUND. Cancer Facts and Figures 2022. **World Cancer Research Fund International**, [S. l.], p. 1–4, 2022. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2022.html>

YEE, A.J. M et al. The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1–11, 2007. DOI: 10.1186/bcr1751.

ZHAO, S.; ZUO, W.; SHAO, Z.; JIANG, Y. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. **Annals of Translational Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 499–499, 2020. DOI: 10.21037/atm.2020.03.194.

ZHOU, Y. et al. The prognostic significance of TILs as a biomarker in triple-negative breast cancer: What is the role of TILs in

TME of TNBC? **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 2885–2897, 2021. DOI: 10.26355/eurrev\_202104\_25542.

## Anexo A - Fichas de protocolo



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Comitê de Ética em Pesquisa

**LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA**

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

PATOLOGIA MAMÁRIA COMPARADA: ESTUDO DA INTERAÇÃO MATRIZ  
 EXTRACELULAR E CÂNCER

**FICHA DE PROTOCOLO**

**Paciente (iniciais):**

**Idade ao diagnóstico:**

**Data de nascimento:**

**Status menopausal:**

\_\_\_\_\_ pré menopausa

\_\_\_\_\_ pós menopausa

**Estadiamento:**

Localizada

Avançada

**T:** \_\_\_\_\_

**N:** \_\_\_\_\_

**M:** \_\_\_\_\_

**AJCC:** \_\_\_\_\_

**Tratamento cirúrgico:**

- Data da cirurgia: \_\_\_\_\_

- Tratamento local:  Quadrantectomia

Mastectomia

- Manejo de axila:  Esvaziamento axilar

Linfonodo sentinela

**Dados da anatomia patológica:**

- Tamanho (mm):
- Grau histológico final:
- Grau tubular:
- Grau nuclear:
- Índice mitótico:
- Margens:  livres  comprometidas  não avaliado
- Linfonodos Acometidos:  Não  Sim. Número: \_\_\_\_\_  não avaliado

**Dados da imuno-histoquímica:**

- HER 2:  2+/FISH ou CISH+  3+
- Receptor de estrogênio:  Positivo. \_\_\_\_\_%  Negativo  
 Não avaliado
- Receptor de progesterona:  Positivo. \_\_\_\_\_%  Negativo  
 Não avaliado
- Ki67:

**Versican:**

Intensidade:

% de área positiva:

Escore:

**Versikina:**

Intensidade:

% de área positiva:

Escore:

**TILS:****CD4:**

1: \_\_\_\_\_

2: \_\_\_\_\_

3: \_\_\_\_\_

4: \_\_\_\_\_

5: \_\_\_\_\_

**CD8+:**

1: \_\_\_\_\_

2: \_\_\_\_\_

3: \_\_\_\_\_

4: \_\_\_\_\_

5: \_\_\_\_\_

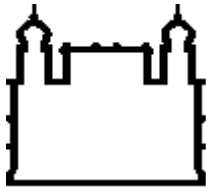
**Radioterapia adjuvante:**  Sim  Não**Hormonioterapia adjuvante:**  Sim  Não**Quimioterapia adjuvante:**  Sim. Esquema:  Não

- Data do início:

- Data do término:

**Desfecho:**- Recidiva:  Sim. Data: \_\_\_\_\_  não- Óbito:  Sim. Data: \_\_\_\_\_  não

Anexo B - Ficha de protocolo: grupo controle



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Comitê de Ética em Pesquisa

**LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA**  
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

**PATOLOGIA MAMÁRIA COMPARADA: ESTUDO DA INTERAÇÃO MATRIZ  
EXTRACELULAR E CÂNCER**

**FICHA DE PROTOCOLO: CONTROLE**

**Paciente (iniciais):**

**Data da cirurgia:**

**Data de nascimento:**

**Versican:**

Intensidade:

% de área positiva:

Escore:

**Versikina:**

Intensidade:

% de área positiva:

Escore:

**CD4:**

1: \_\_\_\_\_

2: \_\_\_\_\_

3: \_\_\_\_\_

4: \_\_\_\_\_



5: \_\_\_\_\_

**CD8+:**

1: \_\_\_\_\_

2: \_\_\_\_\_

3: \_\_\_\_\_

4: \_\_\_\_\_

5: \_\_\_\_\_

**Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Grupo Casos**

**Ministério da Saúde**  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**

**LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA**  
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTO**

**Nome do Projeto:** PATOLOGIA MAMÁRIA COMPARADA: ESTUDO DA INTERAÇÃO MATRIZ EXTRACELULAR E CÂNCER

**Nome do Participante:**

---

**Investigador Principal:** Karine Araújo Damasceno, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

**Comitê de Ética:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

**Introdução:** Você está sendo convidada a participar de um estudo chamado “Patologia mamária comparada: Estudo da interação matriz extracelular e câncer”. Você foi selecionada como um possível participante pois no período de 2001 a 2021 você apresentou um nódulo na mama com diagnóstico de câncer. Por gentileza, leia este documento com tranquilidade e tire todas as dúvidas que surgirem antes de aceitar participar deste estudo.

**Porque o estudo está sendo feito:** O câncer de mama é uma das neoplasias mais frequentes na mulher em todo o mundo. Existem vários fatores que predispõe seu desenvolvimento como a genética, desequilíbrios hormonais e hábitos de vida. Os tratamentos são diversos, mas ainda não se sabe como impedir o desenvolvimento de metástase, ou seja,

que o câncer se espalhe para outros órgãos. Por isso, o objetivo desse estudo é avaliar a expressão de algumas moléculas que indiquem uma relação com a capacidade invasora e metastática do câncer.

**Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:** Cerca de 150 mulheres com câncer de mama farão parte desse estudo.

**Procedimentos envolvidos no estudo:** Caso concorde em participar deste estudo, você apenas deverá assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que possamos ter acesso a uma pequena amostra do seu tumor que já foi retirado durante a cirurgia para que fosse realizado o diagnóstico histopatológico e que, posteriormente, foi arquivado no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas /UFBA, no Laboratório de Anatomia Patológica da Clínica Médica e Imagem (Grupo CAM) ou no Laboratório de Patologia IMAGEPAT. Além disso, permitir que os pesquisadores envolvidos tenham acesso aos dados informados por você e pelo médico que lhe atendeu, as quais estão descritos no seu prontuário arquivados no Hospital das Clínicas (HUPES/UFBA) ou Clínica AMO, ambos localizados em Salvador, Bahia.

**Duração do Estudo:**

O estudo terá uma duração de dois anos. Nesse período você poderá ser contactada para algum esclarecimento referente a sua saúde.

**Riscos envolvidos no estudo:**

Todos os procedimentos de coleta de dados durante a sua participação no projeto não oferecerão desconfortos, riscos ou danos à sua saúde.

**Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:**

Este estudo tem um caráter puramente descritivo quanto aos processos patológicos que ocorrem no desenvolvimento do tumor. Por isso, você não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá futuramente contribuir no entendimento da progressão neoplásica, na pesquisa de novos marcadores tumorais e assim ajudar outras pessoas com câncer de mama.

**Confidencialidade:**

Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em total confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe. Representantes do Comitê de Ética Em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes. Para proteger contra violação de informação ou falsificação as informações que forem cadastradas

em computadores sofrerão seguintes precauções: Todas as informações do banco de dados terão um código ao invés do seu nome, e as informações deste código será mantida em local seguro. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

**Participação Voluntária:**

A sua participação no estudo é voluntária e você contribuirá para o melhor entendimento da sua doença. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar a qualidade e a disponibilidade da assistência médica que lhe será prestada. Em caso de algum dano que possa sofrer devido a sua participação nesta pesquisa, você terá direito a assistência e terá o direito de requerer indenização.

**Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

**Utilização, armazenamento e descarte dos dados:**

Para a realização desse estudo, que será feito com uma pequena amostra de seu tumor que já está armazenado no Serviço de Anatomia Patologia, gostaríamos de sua permissão para utilizar sua amostra ou parte dela, em outros estudos que possam ser realizados no futuro. Como muitas descobertas são realizadas a todo tempo em relação a expressão de moléculas relacionadas ao comportamento biológico do câncer, gostaríamos de ter sua amostra guardada para fazer novos exames, no futuro. Mesmo que permita a utilização futura, você poderá voltar atrás nesta decisão a qualquer momento. Vale ressaltar que utilização da sua amostra em nova pesquisa, esta será submetida ao CEP-IGM/Fiocruz para avaliar os novos objetivos propostos.

Marque abaixo a opção desejada sobre esta questão.

**Autoriza armazenamento e utilização das amostras coletadas para pesquisas futuras?**

Sim, autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

Não autorizo armazenamento e utilização das amostras para pesquisas futuras

**Esclarecimentos:**

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Karine Araújo Damasceno, coordenadora do projeto, pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da

FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

**Consentimento** – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma via deste formulário para guardar.

_____	_____
Assinatura do Participante	Data
_____	_____
Assinatura do Pesquisador	Data
_____	_____
Assinatura da Testemunha	Data

**Anexo D - Termo de Consentimento Livre E Esclarecido: Grupo Controle**

**Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Comitê de Ética em Pesquisa**

**LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ-BA  
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal CEP: 40296-710 – Salvador-BA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTO**

**Nome do Projeto:** PATOLOGIA MAMÁRIA COMPARADA: ESTUDO DA INTERAÇÃO MATRIZ EXTRACELULAR E CÂNCER

**Nome do Participante:**

---

**Investigador Principal:** Karine Araújo Damasceno, Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347

**Comitê de Ética:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 285

**Introdução:** Você está sendo convidada a participar de um estudo chamado “Patologia mamária comparada: Estudo da interação matriz extracelular e câncer”. Você foi selecionada como possível participante do grupo de **mama normal** pois realizou cirurgia plástica e **com resultado de anatomia patológica sem alterações mamárias (MAMA NORMAL)**. Por gentileza, leia este documento com tranquilidade e tire todas as dúvidas que surgirem antes de aceitar participar deste estudo.

**Porque o estudo está sendo feito:** O câncer de mama é uma das neoplasias mais frequentes na mulher em todo o mundo. Existem vários fatores que predis põe seu desenvolvimento como a genética, desequilíbrios hormonais e hábitos de vida. Os tratamentos

são diversos, mas ainda não se sabe como impedir o desenvolvimento de metástase, ou seja, que o câncer se espalhe para outros órgãos. Por isso, o objetivo desse estudo é avaliar a expressão de algumas moléculas que indiquem uma relação com a capacidade invasora do câncer. Para esse estudo é necessário comparar a expressão dessas moléculas no câncer de mama com a **expressão na mama normal (este é o grupo que você está sendo selecionado para participar)**.

**Quantas pessoas vão fazer parte deste estudo:** Cerca de 86 mulheres com câncer de mama (grupo de casos) e 20 mulheres com **MAMA NORMAL** (grupo controle) farão parte desse estudo.

**Procedimentos envolvidos no estudo:** Caso concorde em participar deste estudo, você apenas deverá assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para que possamos ter acesso a uma pequena amostra do tecido da mama que já foi retirado durante a cirurgia e que, posteriormente, foi arquivado no Laboratório de Patologia IMAGEPAT.

**Duração do Estudo:**

O estudo terá uma duração de dois anos. Não será necessário durante esse período novo contato ou fornecimento de exames ou qualquer outro dado.

**Riscos envolvidos no estudo:**

Todos os procedimentos realizados no projeto não oferecerão desconfortos, riscos ou danos à sua saúde.

**Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:**

Este estudo tem um caráter puramente descritivo quanto aos processos patológicos que ocorrem no desenvolvimento do tumor. Por isso, você não receberá benefícios diretos em participar deste estudo, entretanto, o conhecimento gerado a partir desta pesquisa poderá futuramente contribuir no entendimento do câncer de mama, na pesquisa de novos marcadores tumorais e assim ajudar pessoas com câncer de mama.

**Confidencialidade:**

Todas as informações pessoais e dados médicos serão mantidos em total confidencialidade. As informações médicas dos participantes deste estudo serão armazenadas de acordo com exigências legais. Qualquer informação obtida neste estudo será compartilhada apenas com outros membros da equipe. Representantes do Comitê de Ética Em Pesquisa da FIOCRUZ-BA poderão ter acesso aos seus dados. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes. Para proteger contra violação de informação ou falsificação as informações que forem cadastradas em computadores sofrerão seguintes precauções: Todas as informações do banco de dados terão

um código ao invés do seu nome, e as informações deste código será mantida em local seguro. O banco de dados será protegido por senha e apenas os membros da equipe de pesquisa têm esta senha.

**Participação Voluntária:**

A sua participação no estudo é voluntária e você contribuirá para o melhor entendimento do câncer de mama. Você é livre para recusar a participar do estudo, ou se retirar em qualquer época após o seu início.

**Custos:**

Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

**Utilização, armazenamento e descarte dos dados:**

Para a realização desse estudo, que será feito com uma pequena amostra do seu tecido da mama (que não tem alterações patológicas) a que já está armazenado no Serviço de Anatomia Patologia.

**Esclarecimentos:**

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam nesse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Karine Araújo Damasceno, coordenadora do projeto, pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.: (71) 3176-2200, ramal: 347, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710, tel.:(071) 3176-2285, e-mail: cep@bahia.fiocruz.br.

**Consentimento** – Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita a participação do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma via deste formulário para guardar.

Assinatura do Participante	Data

Assinatura do Pesquisador	Data

Assinatura da Testemunha	Data



**Anexo E - Correlação de VCAN e características clínicas e anatomopatológicas**

<b>VARIÁVEL</b>	<b>VCAN INTENSIDADE</b>	<b>VCAN ESCORE</b>	<b>VCAN CATEGORIA</b>
<b>Idade</b>	0,015 p 0,899	-0,018 p 0,882	0,044 p 0,720
<b>Status menopausa</b>	0,081 p 0,501	0,0027 p 0,823	0,036 p 0,771
<b>Estadiamento</b>	-0,021 p 0,862	0,052 p 0,666	0,124 p 0,313
<b>Tamanho do tumor (T1, T2, T3, T4)</b>	-0,054 p 0,653	0,013 p 0,915	0,095 p 0,439
<b>Acometimento linfonodal (sim ou não)</b>	-0,041 p 0,734	-0,026 p 0,825	0,040 p 0,746
<b>Linfonodos acometidos (N1, N2, N3)</b>	-0,069 p 0,565	-0,012 p 0,920	0,080 p 0,517
<b>Grau histológico (G1, G2, G3)</b>	-0,182 p 0,126	-0,036 p 0,764	-0,060 p 0,625
<b>Receptor de estrógeno</b>	0,213 p 0,073	0,140 p 0,240	0,146 p 0,234
<b>Receptor de progesterona</b>	0,145 p 0,225	0,124 p 0,298	0,135 p 0,271
<b>HER2</b>	-0,070 p 0,557	-0,057 p 0,631	-0,030 p 0,807
<b>Ki67 (%)</b>	-0,008 p 0,945	0,002 p 0,997	-0,042 p 0,731
<b>TILS (%)</b>	-0,043 p 0,723	-0,072 p 0,548	-0,073 p 0,552
<b>CD4</b>	0,196 p 0,121	0,083 p 0,514	0,084 p 0,522
<b>CD8+</b>	0,089 p 0,473	0,069 p 0,579	0,088 p 0,494

**Método:** Matriz de correlação de Spearman

**Fonte:** Elaborado pela autora

**Anexo F - Correlação de VKINA e características clínicas e anatomopatológicas**

<b>VARIÁVEL</b>	<b>VKINA INTENSIDADE</b>	<b>VKINA ESCORE</b>	<b>VKINA CATEGORIA</b>
<b>Idade</b>	0,097 p 0,444	-0,113 p 0,368	-0,027 p 0,833
<b>Status menopausa</b>	-0,090 p 0,478	-0,088 p 0,485	-0,058 p 0,644
<b>Estadiamento</b>	-0,169 p 0,180	0,060 p 0,637	-0,030 p 0,810
<b>Tamanho do tumor (T1, T2, T3, T4)</b>	-0,217 p 0,083	-0,004 p 0,973	-0,012 p 0,925
<b>Acometimento linfonodal (sim ou não)</b>	0,125 p 0,321	-0,015 p 0,903	-0,053 p 0,674
<b>Linfonodos acometidos (N1, N2, N3)</b>	0,109 p 0,387	0,008 p 0,950	-0,021 p 0,868
<b>Grau histológico (G1, G2, G3)</b>	-0,098 p 0,436	0,036 p 0,774	0,029 p 0,818
<b>Receptor de estrógeno</b>	0,022 p 0,860	-0,113 p 0,368	-0,039 p 0,757
<b>Receptor de progesterona</b>	0,099 p 0,431	-0,074 p 0,557	-0,024 p 0,852
<b>HER-2</b>	-0,001 p 0,993	-0,083 p 0,508	-0,037 p 0,769
<b>Ki67 (%)</b>	0,110 p 0,381	0,181 p 0,148	0,149 p 0,235
<b>TILS (%)</b>	0,031 p 0,807	0,008 p 0,951	0,050 p 0,694
<b>CD4</b>	0,132 p 0,326	0,103 p 0,447	0,101 p 0,453
<b>CD8+</b>	-0,111 p 0,400	-0,117 p 0,373	-0,003 p 0,982

**Método:** Matriz de correlação de Spearman

**Fonte:** Elaborado pela autora

## Anexo G - Comparação entre VCAN e características clínicas e patológicas

VARIÁVEL	X ≤ 41,25 MÉDIA (± DP)	41,25 ≤ X ≤ 157,5 MÉDIA (± DP)	X > 157,5 MÉDIA (± DP)	P-VALOR
<b>Idade (anos)</b>	57,9 (±3,0)	61,0 (±2,2)	60,2 (±3,2)	0,738
Mínima	35	33	39	
Máxima	75	85	92	
<b>Linfonodos acometidos</b>	2,0 (±1,5)	0,7 (±0,4)	1,3 (±0,6)	0,503
Mínimo	0	0	0	
Máximo	25	11	10	
<b>Tamanho do tumor (mm)</b>	19,0 (±3,1)	18,6 (±1,2)	20,6 (±1,4)	0,703
Mínimo	7	6	8	
Máximo	55	35	30	
<b>Receptor de estrogênio (%)</b>	76,5 (±9,6)	79,1 (±6,7)	86,7 (±6,1)	0,683
Mínimo	0	0	0	
Máximo	100	100	100	
<b>Receptor de progesterona (%)</b>	40,6 (±9,5)	55,8 (±7,8)	64,0 (±8,1)	0,235
Mínimo	0	0	0	
Máximo	100	100	100	
<b>KI67 (%)</b>	41,1 (±7,2)	32,3 (±4,1)	36,3 (±5,6)	0,511
Mínimo	3	0	5	
Máximo	90	90	80	
<b>CD4</b>	4,8 x 10 <sup>-3</sup> (±2 x 10 <sup>-3</sup> )	5,4 x 10 <sup>-3</sup> (±1 x 10 <sup>-3</sup> )	5,1 x 10 <sup>-3</sup> (±1 x 10 <sup>-3</sup> )	0,953
Mínimo	0	0	0	
Máximo	22,5 x 10 <sup>-3</sup>	26 x 10 <sup>-3</sup>	15 x 10 <sup>-3</sup>	
<b>CD8+</b>	2,8 x 10 <sup>-3</sup> (±0,6 x 10 <sup>-3</sup> )	3,0 x 10 <sup>-3</sup> (±0,5 x 10 <sup>-3</sup> )	3,3 x 10 <sup>-3</sup> (±0,5 x 10 <sup>-3</sup> )	0,862
Mínimo	0	0	0	
Máximo	7,8 x 10 <sup>-3</sup>	10,06 x 10 <sup>-3</sup>	8,7 x 10 <sup>-3</sup>	
<b>VARIÁVEL</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	
<b>Idade categoria</b>				
Menor que 50 anos				0,916
Maior ou igual a 50 anos	4 (25,0)	8 (21,6)	5 (26,3)	
	12 (75,0)	29 (78,4)	14 (73,7)	
<b>Status de menopausa</b>				0,873
Pré menopausa	5 (31,3)	10 (27,0)	5 (26,3)	

Pós menopausa	11 (68,8)	27 (73,0)	14 (73,7)	
<b>Tamanho do tumor categorizado</b>				0,607
T1	11(68,8)	22 (59,6)	10 (52,6)	
T2	4 (25,0)	15 (40,5)	9 (47,4)	
T3	1 (6,3)	0	0	
<b>Acometimento do linfonodo</b>				0,927
Não	11 (68,8)	23 (62,2)	12 (63,2)	
Sim	5 (31,2)	14 (37,8)	7 (36,8)	
<b>Categoria dos linfonodos</b>				0,952
N0	11 (68,8)	23 (62,2)	11 (57,9)	
N1	3 (18,8)	6 (16,2)	4 (21,1)	
N1mi	0	4 (10,8)	2 (10,5)	
N2	1 (6,3)	1 (2,7)	1 (5,3)	
N3	1 (6,3)	3 (8,1)	1 (5,3)	
<b>Grau histológico final</b>				0,987
1	2 (12,5)	6 (16,2)	3 (15,8)	
2	5 (31,3)	13 (35,1)	7 (36,8)	
3	9 (56,3)	18 (48,6)	9 (47,4)	
<b>TILS categorizado</b>				0,342
TILS baixo	11 (68,8)	24 (64,9)	14 (73,7)	
TILS intermediário	1 (6,2)	9 (24,3)	3 (15,8)	
TILS alto	4 (25,0)	4 (10,8)	2 (10,5)	
<b>RE</b>				0,454
Negativo	3 (18,7)	6 (16,2)	1 (5,3)	
Positivo	13 (81,3)	31 (83,8)	18 (94,7)	
<b>RP</b>				0,507
Negativo	4 (25,0)	8 (21,6)	2 (10,5)	
Positivo	12 (75,0)	29 (78,4)	17 (89,5)	
<b>HER2</b>				0,856
Negativo	12 (75,0)	31 (83,8)	15 (78,9)	
Positivo	4 (25,0)	6 (16,2)	4 (21,1)	

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Testes estatísticos: ANOVA seguido do teste de Tukey e Qui-quadrado seguido da avaliação do resíduo ajustado.

**Fonte:** Elaborado pela autora

**Anexo H - Comparação entre VKIN e características clínicas e patológicas**

	<b>X &lt; 37,5</b>	<b>37,5 &lt;= X &lt;142,5</b>	<b>X &gt;= 142,5</b>	<b>P-VALOR</b>
<b>VARIÁVEL</b>	<b>MÉDIA (± DP)</b>	<b>MÉDIA (± DP)</b>	<b>MÉDIA (± DP)</b>	
<b>Idade (anos)</b>	60,4 (±2,8)	58,8 (±2,4)	59,3 (±3,1)	0,933
Mínima	45	33	35	
Máxima	79	92	77	
<b>Linfonodos acometidos</b>	0,3 (±0,1)	1,6 (±0,5)	0,6 (±0,3)	0,539
Mínima	0	0	0	
Máxima	1	11	4	
<b>Tamanho do tumor (mm)</b>	17,8 (±2,2)	21,7 (±1,7)	18,3 (±2,0)	0,202
Mínima				
Máxima	8	9	7	
	30	55	35	
<b>Receptor de estrógeno</b>	69,9 (±13,8)	84,0 (±6,1)	81,7 (±9,0)	0,729
Mínima	0	0	0	
Máxima	100	100	100	
<b>Receptor de progesterona</b>	50,5 (±14,4)	57,7 (±7,5)	55,5 (±11,0)	0,850
Mínima	0	0	0	
Máxima	100	100	100	
<b>KI67</b>	35,0 (±7,8)	36,4 (±4,3)	40,7 (±7,5)	0,421
Mínima	10	3	5	
Máxima	80	90	90	
<b>CD4</b>	3,1 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,9 x 10 <sup>-3</sup> )	4,8 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,9 x 10 <sup>-3</sup> )	6,2 x 10 <sup>-3</sup> (± 1 x 10 <sup>-3</sup> )	0,439
Mínima	0	0	0	
Máxima	22 x 10 <sup>-3</sup>	22 x 10 <sup>-3</sup>	25 x 10 <sup>-3</sup>	
<b>CD8+</b>	3,8 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,4 x 10 <sup>-3</sup> ) AB	2,4 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,4 x 10 <sup>-3</sup> ) A	3,8 x 10 <sup>-3</sup> (± 0,7 x 10 <sup>-3</sup> ) B	0,040*
Mínima	2,1 x 10 <sup>-3</sup>	0	0	
Máxima	5,6 x 10 <sup>-3</sup>	8,7 x 10 <sup>-3</sup>	7,8 x 10 <sup>-3</sup>	
<b>VARIÁVEL</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
<b>Idade categoria</b>				
Menor que 50 anos	2 (14,3)	10 (29,4)	3 (17,6)	0,436
Maior ou igual a 50 anos	12 (85,7)	24 (70,6)	14 (82,4)	
<b>Status de menopausa</b>				
Pré menopausa	2 (14,3)	11 (32,4)	4 (23,5)	
Pós menopausa	12 (85,7)	23 (67,6)	13 (76,5)	0,415
<b>Tamanho do tumor categorizado</b>				0,870
T1	9 (64,3)	19 (55,9)	11 (64,7)	
T2	5 (35,7)	14 (41,2)	6 (35,3)	
T3	0	1 (2,9)	0	

<b>Acometimento do linfonodo</b>				
Não	9 (64,3)	20 (58,8)	12 (70,6)	0,710
Sim	5 (35,7)	14 (41,2)	5 (29,4)	
<b>Categoria dos linfonodos</b>				
N0	9 (64,3)	20 (58,8)	11 (64,7)	0,950
N1	3 (21,4)	6 (17,6)	4 (23,5)	
N1mi	1 (7,1)	4 (11,8)	1 (5,9)	
N2	0	2 (5,9)	1 (5,9)	
N3	1 (7,1)	2 (5,9)	0	
<b>Grau histológico final</b>				
1	2 (14,3)	5 (14,7)	2 (11,8)	0,996
2	5 (35,7)	13 (38,2)	6 (35,3)	
3	7 (50,0)	16 (47,1)	9 (52,9)	
<b>TILS categorizado</b>				
TILS baixo	9 (64,3)	24 (70,6)	10 (58,8)	0,647
TILS intermediário	2 (14,3)	7 (20,6)	3 (17,6)	
TILS alto	3 (21,4)	3 (8,8)	4 (23,5)	
<b>Receptor de progesterona</b>				
Negativo	2 (14,3)	4 (11,8)	3 (17,6)	0,847
Positivo	12 (85,7)	30 (88,2)	14 (82,4)	
<b>Receptor de estrogênio</b>				
Negativo	3 (21,4)	6 (17,6)	4 (23,5)	0,875
Positivo	11 (78,6)	28 (82,4)	13 (76,5)	

Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas demonstram diferença estatística entre grupos ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Testes estatísticos: ANOVA seguido do teste de Tukey e Qui-quadrado seguido da avaliação do resíduo ajustado.

**Fonte:** Elaborado pela autora