



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

IZABEL CRISTINA DA ROCHA LEÃO CRIVELLI NUNES DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO
NEOPLÁSICAS (CTNs), DE PROLIFERAÇÃO E DE INFLAMAÇÃO NO CÂNCER
DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
CLINICOPATOLÓGICAS DA DOENÇA E COM A OBESIDADE**

CAMPINAS

2022

IZABEL CRISTINA DA ROCHA LEÃO CRIVELLI NUNES DA SILVA

INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO
NEOPLÁSICAS (CTNs), DE PROLIFERAÇÃO E DE INFLAMAÇÃO NO CÂNCER
DE MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
CLINICOPATOLÓGICAS DA DOENÇA E COM A OBESIDADE

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, área
de Concentração Patologia Clínica.

ORIENTADORA: SÍLVIA DE BARROS MAZON

COORIENTADOR: CASSIO CARDOSO FILHO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
IZABEL CRISTINA DA ROCHA LEÃO CRIVELLI NUNES DA SILVA,
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. SÍLVIA DE BARROS MAZON

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Rosana Evangelista Poderoso - CRB 6652

Si38i Silva, Izabel Cristina da Rocha Leão Crivelli Nunes da, 1978-
Investigação da expressão de marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs), de proliferação e de inflamação no câncer de mama e sua associação com as características clinicopatológicas da doença e com a obesidade / Izabel Cristina da Rocha Leão Crivelli Nunes da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Sílvia de Barros Mazon.
Coorientador: Cassio Cardoso Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células-tronco neoplásicas. 2. Neoplasias da mama. 3. Inflamação. 4. Obesidade. I. Barros-Mazon, Sílvia de, 1956-. II. Cardoso Filho, Cassio, 1974-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Investigation of the expression of markers of cancer stem cells (CSC), proliferation and inflammation in breast cancer and its association with the clinical-pathological characteristics of the disease and with obesity

Palavras-chave em inglês:

Neoplastic stem cells

Breast neoplasms

Inflammation

Obesity

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Sílvia de Barros Mazon [Orientador]

Magnun Nueldo Nunes dos Santos

Rodrigo Gonçalves

Data de defesa: 07-12-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6513-8065>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4058475916558009>

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
IZABEL CRISTINA DA ROCHA LEÃO CRIVELLI NUNES DA SILVA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SÍLVIA DE BARROS MAZON

COORIENTADOR: PROF. DR. CASSIO CARDOSO FILHO

MEMBROS TITULARES

1. PROFA. DRA. SÍLVIA DE BARROS MAZON
2. PROF. DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS
3. PROF. DR. RODRIGO GONÇALVES

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração Patologia Clínica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data da defesa: 07/12/2022

Dedico este trabalho aos meus pais

Maria Lucia da Rocha Leão e Wilson Crivelli Júnior (*In Memoriam*),
que despertaram e incentivaram meu interesse pela Ciência desde a infância

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Sílvia de Barros Mazon - Departamento de Patologia Clínica/FCM, pela orientação, disponibilidade, paciência com as adversidades e apoio incondicional, sem os quais não seria possível a realização deste projeto, principalmente mediante os obstáculos decorrentes da pandemia de Covid-19.

Prof. Dr Cassio Cardoso Filho – Departamento de Tocoginecologia/FCM, pela coorientação e todo auxílio oferecido durante a fase final da dissertação, cuja vivência clínica enriqueceu significativamente o presente estudo.

Prof. Dr. André Almeida Schenka e Dra. Valéria Barbosa de Souza – ambos do Departamento de Farmacologia/FCM, pelo período de parceria e colaboração com o nosso grupo de pesquisa.

Prof. Dr. Magnun Nueldo Nunes dos Santos – Departamento de Patologia/FCM, pelas instigações e sugestões realizadas durante a Qualificação e Defesa da presente dissertação.

Dr. Rodrigo Gonçalves – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela participação na banca e sugestões oferecidas durante a Defesa.

Profa. Dra. Maria Salete da Costa Gurgel – Departamento de Tocoginecologia/FCM e Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria – Departamento de Patologia Clínica/FCM, pela colaboração no projeto original, respectivamente pela parte clínica do projeto e pela viabilização das análises bioquímicas.

Prof. Dr. José Vassalo – Departamento de Anatomia Patológica/FCM, Carlos Ferreira Nascimento – Departamento de Patologia Investigativa do AC Camargo Cancer Center, Dra. Glauce Aparecida Pinto e Marisa de Almeida Matsura – Laboratório de Patologia Especializada (LAPE) – Laboratório de Patologia Especializada (LAPE) do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM, Dra. Luciana Regina Moreira – Laboratório de Citopatologia do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM, desde a confecção dos microarranjos teciduais (TMAs), análises imunoistoquímicas e leituras iniciais.

Cleide Aparecida Moreira Silva – Câmara de Pesquisa/FCM e Helymar da Costa Machado – Departamento de Estatística do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM, pelas análises estatísticas.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Patologia Clínica: Paulo Henrique de Oliveira e Bruna de Almeida Bianchine

Aos funcionários das Seções de Coleta de Exames; Central de Recepção e Separação de Amostras; Imunologia e de Bioquímica da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas – UNICAMP.

Aos funcionários do serviço de Enfermagem da Unidade de Internação - Seção Oncologia do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM.

Rogéria Elias Malaquias (in memoriam) – Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM.

Aos funcionários da Divisão de Oncologia: Neuza Aparecida de Melo Balduci, Débora Fernanda Glicério Andrade Fernandes e Sônia Aparecida Pianca.

A todas as pacientes da Unidade de Internação – Seção Oncologia do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti CAISM, participantes desta pesquisa.

Aos estimados membros do nosso grupo de pesquisa: Katia Jaqueline Davoli, Aline Barros Santana e Higor Campos do Nascimento.

Aos queridos familiares e amigos que apoiaram a jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e auxílios do Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão da Unicamp (FAEPEX/UNICAMP) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo no 2009/17084-7).

Muito obrigada a todos! Graças a vocês, uma aspiração se tornou realidade!

“O caminho do progresso não é rápido nem fácil.”

(Marie Curie)

RESUMO

A obesidade é caracterizada pela inflamação crônica subclínica no tecido adiposo, que produz adipocitocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a Interleucina-6 (IL-6) e a proteína amilóide sérica A (SAA). A inflamação crônica tem sido associada aos processos de gênese, progressão e metástase tumoral e contribui para o desenvolvimento de células tronco neoplásicas (CTNs), que possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação em linhagens múltiplas. A presença de CTNs mamárias está associada a prognóstico desfavorável, resistência à quimio e à radioterapia. Este trabalho investigou a expressão tecidual de marcadores de CTNs (enzima aldeído desidrogenase 1 – ALDH1, glicoproteína de membrana CD44 e fator de transcrição ligador de octâmero 4 – Oct4), de proliferação (Ki-67) e de inflamação (TNF- α , IL-6 e SAA) no câncer de mama e sua relação com as características clinicopatológicas da doença, com a obesidade e com parâmetros associados a ela. A expressão dos marcadores teciduais foi investigada em dois conjuntos de microarranjos de tecidos (*tissue microarray* – TMA), construídos a partir das regiões tumoral (TU) e não tumoral (NT) de espécimes cirúrgicos de 90 pacientes, classificadas em grupo de não obesas (NO) e grupo com sobrepeso/obesidade (SP/O). As análises comparativas entre variáveis contínuas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney, as de associação entre variáveis categóricas pelo teste χ^2 ou exato de Fisher e as de correlações entre variáveis contínuas pelo teste de Spearman. Para análise de sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) foi utilizado o método de Kaplan-Meier, com comparação entre curvas pelo teste log-rank. Para avaliação dos fatores associados à SLD e à SG foi utilizada a análise de regressão de Cox, simples e múltipla. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). A análise do conjunto total de amostras demonstrou expressão diferencial entre os TMAs TU e NT para os marcadores ALDH1, Oct4, Ki-67 e SAA, resultado que permaneceu quando as análises foram direcionadas para as amostras dos grupos NO e SP/O. Não foram detectadas diferenças de expressão de qualquer marcador tecidual entre os TMAs dos grupos NO e SP/O, entretanto foram observadas relações da expressão de alguns marcadores com parâmetros relacionados à obesidade, tais como: ALDH1 no epitélio TU com SAA sérica; TNF- α TU com níveis de colesterol total e LDL-colesterol, IL-6 TU com SAA sérica e associação inversa entre Ki-67 TU e

níveis de HDL-colesterol. As principais associações entre os marcadores teciduais com as características clinicopatológicas da doença foram: ALDH1 no epitélio TU com estadios mais avançados de Ec_p, CD44 no epitélio TU com tumores de GN mais avançados e IL-6 TU com tumores de GH mais avançados. A análise de regressão de Cox múltipla demonstrou influência dos marcadores ALDH1 no estroma TU e IL-6 TU sobre SLD, ou seja: a ausência do marcador ALDH1 no estroma TU apresenta risco de recidiva 13,2 vezes maior e a expressão de IL-6 TU aumenta o risco de recidiva em 7,6 vezes a cada unidade (escore). Em relação à SG, a análise de regressão de Cox múltipla demonstrou que a expressão de IL-6 TU aumenta o risco de óbito em 4,3 vezes a cada unidade (escore). As influências da ALDH1 no estroma TU sobre a SLD e da IL-6 TU sobre as SLD e SG, observadas no presente trabalho, corroboram as observações experimentais reportadas na literatura e estimulam novas frentes de investigação voltadas para a área terapêutica.

Palavras-chave: Células-Tronco Neoplásicas; Neoplasias da Mama; Inflamação; Obesidade.

ABSTRACT

Obesity is characterized by chronic subclinical inflammation in adipose tissue, which produces pro-inflammatory adipocytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), and serum amyloid A protein (SAA). Chronic inflammation has been associated with the processes of tumor genesis, progression, and metastasis and contributes to the development of cancer stem cells (CSCs), which have the capacity for self-renewal and differentiation into multiple lineages. The presence of breast CSCs is associated with unfavorable prognosis, resistance to chemo and radiotherapy. This work investigated the tissue expression of CSCs markers (aldehyde dehydrogenase enzyme 1 – ALDH1; membrane glycoprotein CD44, and octamer binding transcription factor 4 – Oct4), proliferation marker (Ki-67) and inflammation markers (TNF- α , IL-6 and SAA) in breast cancer and their relationship with the clinicopathological characteristics of the disease, with obesity and with parameters associated with it. The expression of tissue markers was investigated in two sets of tissue microarrays (TMA), constructed from the tumor (TU) and non-tumor (NT) regions of surgical specimens from 90 patients, classified into a non-obese group (NO) and overweight/obese group (SP/O). The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables, the χ^2 or Fisher's exact test was used for the association between categorical variables and Spearman's test for correlations between continuous variables. For analysis of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS), the Kaplan-Meier method was used, with the comparison between curves using the log-rank test. Cox regression analysis, simple and multiple, was used to evaluate the factors associated with DFS and OS. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$). Analysis of the total set of samples demonstrated differential expression for the markers ALDH1, Oct4, Ki-67 and SAA between TU and NT TMAs, a result that remained when the analyzes were directed to samples from the NO and SP/O groups. No differences in the expression of any tissue marker were detected between the TMAs of the NO and SP/O groups, however, relationships of the expression of some markers with obesity-related parameters were observed, such as: ALDH1 in the TU epithelium with serum SAA; TNF- α TU with total cholesterol and LDL-cholesterol levels; IL-6 TU with serum SAA, and inverse association between Ki-67 TU and HDL-cholesterol levels. The main associations between tissue markers and clinicopathological features of the disease were: ALDH1 in TU epithelium with more advanced stages of the disease, CD44 in TU epithelium and IL-6 TU with more advanced tumors. Multiple Cox regression analysis demonstrated the influence of ALDH1 in the TU stroma and IL-6 TU on DFS, i.e.: absence of the ALDH1 marker in the TU stroma presents 13.2-fold increased risk of recurrence and expression of IL-6 TU increases the risk of recurrence by 7.6-fold for each unit (score). Regarding OS, multiple Cox regression analysis demonstrated that IL-6 TU expression increases the risk of death by 4.3-fold for every unit (score). The influences of ALDH1 in the TU stroma on DFS and of IL-6 TU on DFS and OS,

observed in the present study, corroborate the experimental observations reported in the literature and stimulate new research approaches focused on the therapeutic area.

Key words: Cancer Stem Cells, Breast cancer, Inflammation, Obesity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1: Agrupamento das pacientes em estudo.....	32
Figura 1: Blocos e lâminas pareadas e demarcadas nas áreas de interesse para confecção do TMA.....	34
Figura 2: Esquema de construção de blocos e obtenção de cortes de microarranjo tecidual (<i>tissue microarray</i> - TMA).....	34
Quadro 1. Características dos anticorpos anti-marcadores de CTNs, de proliferação celular e de inflamação.....	36
Figura 3: Exemplo de reação imunoistoquímica citoplasmática em carcinoma invasivo.....	37
Figura 4: Exemplo de reação imunoistoquímica nuclear em carcinoma invasivo.....	37
Figura 5: Relação inversa entre frequências de expressão mais elevadas do marcador de proliferação Ki-67 (Ki-67>20) com os níveis plasmáticos de HDL-Col abaixo do VR para mulheres (VR: HDL-Colesterol \geq 50 mg/dL).....	49
Figura 6: Comparação das frequências de expressão de marcadores teciduais entre tercís de concentrações séricas de SAA.....	50
Figura 7: Influência da ALDH1Es-TU sobre a SLD.....	56
Figura 8: Influência da IL-6 TU sobre a SLD.....	56
Figura 9: Influência dos subtipos moleculares sobre a SLD.....	57
Figura 10: Influência dos subtipos moleculares sobre a SG.....	60
Figura 11: Influência da IL-6 TU na SG.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escores finais obtidos pela análise simultânea dos parâmetros: intensidade de reação e porcentagem de células reativas.....	38
Tabela 2 – Classificação das variáveis dicotômica.....	39
Tabela 3 – Dados demográficos, antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e clinicopatológicos das participantes, com comparação entre os grupos NO e SP/O.....	42
Tabela 4 – Frequência dos marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs), de proliferação e de inflamação nos microarranjos de tecido tumoral (TU) e não tumoral (NT) do grupo total de pacientes.....	45
Tabela 5 – Comparação das Frequências dos Marcadores de Células Tronco Neoplásicas (CTNs), de Proliferação e de Inflamação nos microarranjos de tecido tumoral (TU) e não tumoral (NT) entre os grupos de pacientes NO e SP/O.....	47
Tabela 6 – Associação entre a expressão de marcadores teciduais e as características clinicopatológicas da doença.....	48
Tabela 7 – Correlações dos escores de expressão de marcadores teciduais com dados demográficos, antropométricos, bioquímicos e inflamatórios séricos das participantes.....	52
Tabela 8 – Influência dos diferentes fatores sobre a SLD pela regressão de Cox univariada.....	54
Tabela 9 – Influência dos marcadores teciduais tumorais e subtipos moleculares sobre a SLD pela regressão de Cox múltipla após ajuste pelas variáveis de controle	55
Tabela 10 – Influência dos diferentes fatores sobre a SG pela regressão de Cox univariada.....	58
Tabela 11 – Influência da IL-6 TU e dos subtipos moleculares sobre a SG pela regressão de Cox múltipla após ajuste pelas variáveis de controle.....	59

Tabela 12 – Características das participantes com eventos relacionados à ausência de expressão de ALDH1 nos estromas dos microarranjos tumorais (ALDH1Es-TU)..... 61

Tabela 13 – Características das participantes com eventos relacionados à expressão de IL-6, com escore ≥ 3 , nos microarranjos tumorais (IL-6TU)..... 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> – Comitê Conjunto Americano de Câncer
ALDH1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1</i> – enzima aldeído desidrogenase 1
AR	ácido retinóico
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CA	circunferência abdominal
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i> – grupo de diferenciação 44 (glicoproteína de superfície celular)
CDI	carcinoma ductal invasivo
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Col-T	colesterol total
CSC	Cancer Stem Cells
CTNs	células-tronco neoplásicas
DAB	<i>3,3'-diaminobenzidine</i> – 3,3'-diaminobenzidina
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> – dimetilsulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
Ec _p	estadiamento clinicopatológico
Ep	epitélio
Es	estroma
ESA	<i>epithelial specific antigen</i> – antígeno epitelial específico
FAK	<i>focal adhesion kinase</i> – quinase de adesão focal
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GH	grau histológico
Gli	glicose
GN	grau nuclear
HDL-Col	<i>high-density lipoprotein-cholesterol</i> – lipoproteína de alta densidade -colesterol
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> – receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HR	<i>Hazard Ratio</i> – razão de risco
HT	hormonioterapia
H&E	hematoxilina e eosina

IC	intervalo de confiança
IGFs	<i>insulin-like growth factors</i> – fatores de crescimento insulina- <i>like</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i> – fator de crescimento insulina- <i>like</i> 1
IL-1	<i>interleukin-1</i> – Interleucina 1
IL-1 β	<i>interleukin-1β</i> – Interleucina 1 beta
IL-6	<i>interleukin-6</i> – Interleucina 6
IMC	índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IT	imunoterapia
JAK	<i>Janus Kinase</i> – Janus quinase (família de enzimas transdutora de sinais mediados por citocinas através da via JAK-STAT)
Ki-67	marcador nuclear de proliferação celular, produzido na cidade de Kiel (Ki) com a referência ao número do clone original (67)
LDL-Col	<i>low-density lipoprotein-cholesterol</i> – lipoproteína de baixa densidade -colesterol
N	acometimento de linfonodos regionais
n	quantidade de participantes no estudo/ quantidade de amostras avaliadas
NO	grupo de pacientes não obesas
NT	tecido não tumoral
Oct4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i> – fator de transcrição Oct4
<i>p</i>	<i>probability value</i> – valor-p (probabilidade de significância estatística)
PCR	proteína C reativa
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> – solução salina tamponada com fosfato
QT	quimioterapia
<i>r</i>	<i>correlation coefficient</i> – coeficiente de correlação
RAR	<i>retinoic acid receptor</i> – receptor de ácido retinóico
RE	receptor de estrógeno
ref.	referência
RP	receptor de progesterona
RT	radioterapia
RXR	<i>retinoid X receptor</i> – receptor retinóide X
SAA	<i>serum amyloid A</i> – proteína amilóide sérica A
SG	sobrevida global

SLD	sobrevida livre de doença
SP/O	grupo de pacientes com sobrepeso/obesidade
StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i> – proteína de regulação aguda da esteroidogênese
StArD3	<i>StAR related lipid transfer domain-3</i> – domínio-3 do transportador de lípidos relacionado à proteína StAR
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> – transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TG	triglicerídeos
TMA	<i>tissue microarray</i> – microarranjo de tecido
TN	câncer de mama triplo negativo
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i> – fator de necrose tumoral-alfa
TNM	sistema de estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase
TU	tecido tumoral
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	radiação ultravioleta
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> – fator de crescimento endotelial vascular
VR	valor de referência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Câncer de Mama.....	21
1.2. Características Clinicopatológicas do Câncer de Mama.....	22
1.3. Câncer de Mama e Obesidade.....	23
1.4. Microambiente Tumoral e CTNs.....	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivos Específicos.....	30
3. MÉTODOS E CASUÍSTICA	31
3.1. Desenho do Estudo.....	31
3.2. Tamanho Amostral.....	31
3.3. Coleta de Dados.....	32
3.4. Critérios de Seleção.....	32
3.4.1. Inclusão.....	32
3.4.2. Exclusão.....	33
3.5. Construção dos Microarranjos de Tecidos - Tissue Microarray (TMA).....	33
3.6. Análise imunoistoquímica para investigação da expressão dos marcadores das CTNs, de proliferação e de inflamação.....	35
3.7. Leitura e interpretação das reações imunoistoquímicas.....	36
3.8. Classificação dos Subtipos Moleculares.....	39
3.9. Análise Estatística.....	39
3.10. Aspectos Éticos.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Características gerais da população estudada.....	41

4.2. Frequência dos marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs), de proliferação e de inflamação nos microarranjos de tecido tumoral (TU) e não tumoral (NT) da população estudada.....	43
4.3. Comparação das Frequências dos Marcadores de Células Tronco Neoplásicas (CTNs), de Proliferação e de Inflamação nos Microarranjos de Tecido Tumoral (TU) e Não Tumoral (NT) entre os Grupos de Pacientes Não-obesas (NO) e Sobrepeso/obesidade (SP/O).....	46
4.4. Avaliação da Correlação das Frequências dos Marcadores de CTNs, de Proliferação e de Inflamação com parâmetros bioquímicos, demográficos e antropométricos das pacientes.....	46
4.5. Avaliação da Correlação das Frequências dos Marcadores de CTNs, de Proliferação e de Inflamação com as concentrações séricas de IL-6, TNF- α e SAA.....	49
4.6. Associação das Frequências dos Marcadores de Células Tronco Neoplásicas (CTNs), de Proliferação e de Inflamação com as Características Clinicopatológicas da Doença, nos diferentes TMAs.....	51
4.7. Avaliação da influência dos marcadores teciduais e séricos na sobrevida livre de doença.....	53
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS.....	75
8. ANEXO.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Mama

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer se manteve entre as principais causas de morte no mundo e o câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, com cerca de 2,26 milhões de casos novos, de acordo com os dados mais recentes (1).

No Brasil, de acordo com a última atualização do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) estimou-se a ocorrência de 73.610 casos novos de câncer de mama para 2023 e foi relatada a morte de 17.825 mulheres em 2020 (2). Esse tipo de neoplasia está na liderança de ocorrência entre as mulheres, com 30,1% do total de casos novos no Brasil, seguido pelo câncer de cólon e reto, com 9,7%. Tais números demonstram que o primeiro foi diagnosticado mais do que três vezes do que o segundo colocado e, além do grande número de casos novos, o câncer de mama foi a neoplasia que causou o maior número de óbito entre as mulheres no país, com 16,5% das ocorrências (3).

A doença é multifatorial e foi constatado que idade superior a 50 anos é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença (2). Outros fatores de risco que influenciam não só o desenvolvimento como também a evolução da doença e a sobrevida são: predisposição genética, primeira gestação após os 30 anos ou nuliparidade, uso de anticoncepcionais e/ou terapia de reposição hormonal, densidade do tecido mamário (razão entre tecido glandular e adiposo), consumo de álcool e/ou dietas hipercalóricas, sedentarismo e exposição à radiação ionizante (4).

O diagnóstico tardio, geralmente associado a mulheres de nível socioeconômico mais baixo, tem contribuído para elevar a taxa de mortalidade, na medida em que aumenta a probabilidade da doença ser diagnosticada em estágios mais avançados (5, 6).

Além disso, o prognóstico do câncer de mama é influenciado pelas características da doença, que é clínica e morfológicamente heterogênea e cujas singularidades tumorais influenciam o crescimento da neoplasia, o potencial de metastização e a resposta aos tratamentos. A maioria dos tumores são carcinomas

originados nas células epiteliais de um ducto mamário (carcinomas ductais) ou no lóbulo mamário (carcinomas lobulares) (7).

1.2. Características Clinicopatológicas do Câncer de Mama

Classificar o câncer de mama é importante para a compreensão do comportamento clínico da doença e seu prognóstico. Desde 1968, a Organização Mundial de Saúde baseia-se principalmente na histologia para realizar a classificação do câncer de mama, sendo a última versão apresentada em 2019, na denominada 5ª edição (8).

A partir de 1977, o AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) vem desenvolvendo versões do sistema de estadiamento TNM, que avalia as dimensões do tumor primário, o acometimento de linfonodos e a presença ou ausência de metástases. A oitava edição desse sistema (9) integra também o *status* dos biomarcadores: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2).

Com base nos níveis de expressão gênica, foram identificados 4 subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER2 e *basal-like* (10), cuja classificação exerce um papel importante na deliberação do prognóstico e tratamento.

Na impossibilidade de acesso à classificação gênica, é possível realizar a classificação em subtipos moleculares, de acordo com o fenótipo do tumor, pela análise imunoistoquímica das expressões de RE, RP e HER2. Além disso, também é avaliada a expressão do marcador de proliferação Ki-67, cujos valores diminuídos ou elevados norteiam a identificação dos subtipos Luminal A ou Luminal B, respectivamente. Desta forma, os subtipos moleculares podem ser classificados em: Luminal A; Luminal B não-HER2; Luminal B-HER2; HER2 amplificado e *basal-like*. O subtipo Luminal A caracteriza tumores RE e RP positivos (+), HER2 negativo (-) e baixa expressão de Ki-67; o Luminal B não-HER2 engloba aqueles com RE+, RP-/baixa expressão, HER2- e elevada expressão de Ki-67; o Luminal B-HER2 caracteriza tumores RE+, com superexpressão de HER2 e com expressão indiferente de RP e Ki-67; o subtipo HER2 apresenta superexpressão de HER2, ausência de expressão de receptores hormonais (RE⁻ e RP⁻) e elevada expressão de Ki-67; finalmente, o basal-like caracteriza-se pela ausência de expressão dos três

receptores (RE⁻, RP⁻ e HER2⁻) e elevada expressão de Ki-67 e é frequentemente referido como triplo negativo (TN) (11).

O Ki-67 é um marcador nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0. Sua detecção é obtida por análise imunohistoquímica, que é utilizada como um método quantitativo para mensurar a proliferação celular. Entretanto, até os dias atuais, existe ainda controvérsia quanto ao seu ponto de corte, principalmente em relação ao tratamento (12-14).

Para avaliação do prognóstico indica-se o uso de painéis multigênicos, que possibilitam averiguar a expressão de múltiplos genes do câncer de mama. Dentre eles, o *Oncotype DX Breast Recurrence Score* avalia a expressão de 21 genes e calcula a probabilidade de recorrência. A desvantagem dos painéis multigênicos é o custo elevado (15).

1.3. Câncer de Mama e Obesidade

Muitos estudos demonstram a associação do câncer de mama com a obesidade. Entre as hipóteses para explicar essa associação, figura o aumento na concentração circulante de estrógeno originário da aromatização de andrógenos no tecido adiposo das mulheres obesas na pós-menopausa (16, 17). Mulheres obesas podem ter um aumento de até 86% nos níveis circulantes de estradiol, 60% de estrona e 20% de testosterona se comparadas a mulheres com peso normal (18).

Muitos tipos de câncer de mama possuem receptor de estrógeno (RE) nas células tumorais e já foi observado que esse hormônio estimula o crescimento do tumor ao aumentar a proliferação celular e inibir a apoptose, também tendo capacidade de promover a metástase (19, 20). Além da presença, a concentração de RE nas células tumorais também exerce influência na ação deste hormônio (21).

Uma outra hipótese leva em consideração a associação da obesidade com a síndrome metabólica e fatores de crescimento insulina-*like* (IGFs). Um desses fatores, o IGF-1, atua tanto na proliferação e migração celular como também na formação de metástase. Por outro lado, parte da ação dos IGFs também poderia ser mediada pela interação dessa via com a via do receptor de estrógeno nas células mamárias (22, 23). Inclusive, já foi observada ação sinérgica entre IGF-1 e estradiol (24, 25). Por sua vez, a hiperinsulinemia decorrente da síndrome metabólica reduz

os níveis da globulina de ligação de hormônios sexuais e, com isso, promove o aumento da biodisponibilidade do estrogênio (18).

Alternativamente, os adipócitos e suas funções autócrina, parácrina e endócrina exercem influência importante no contexto, em decorrência da validação do tecido adiposo como um órgão endócrino (26, 27). O tecido adiposo é capaz de produzir dezenas de diferentes tipos de adipocinas, citocinas e quimiocinas, influenciando o metabolismo e o sistema imunológico. Na presença de obesidade, a hipertrofia dos adipócitos direciona parte deles para a apoptose, o que faz com que macrófagos sejam enviados para a região e iniciem um processo inflamatório de baixo grau, que resulta na lipólise e liberação de lipídios pelos adipócitos no local (28, 29). Como resposta à inflamação associada à obesidade, o tecido adiposo promove um aumento na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1), IL-6, proteína C reativa (PCR) e proteína amilóide sérica A (SAA), assim como eleva a produção de leptina, que é angiogênica e mitogênica (18, 30, 31).

O câncer de mama pode ser originado pela inflamação crônica local, onde citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas moduladoras do sistema imunológico participam da instalação do tumor e da progressão da doença. Entre as citocinas e proteínas de fase aguda que se apresentam elevadas no câncer de mama, destacam-se a IL-6, TNF- α e SAA. Essas moléculas, além de elevadas em níveis séricos, também têm demonstrado participação efetiva na causa e/ou evolução da doença (32-34).

Desta forma, as citocinas pró-inflamatórias representam um papel fundamental na associação entre a inflamação crônica e a transformação maligna, participando das principais vias existentes entre a inflamação e a promoção/progressão do tumor.

A IL-6 atua na regulação fisiológica de vários processos tais como o crescimento e a diferenciação de linfócitos B e T, na formação de colônias de células hematopoiéticas pluripotentes e também na produção hepática de proteínas de fase aguda como a PCR e a SAA (35, 36). Atua também nos processos de apoptose, angiogênese e proliferação celular e pode ter ação pró-tumorigênica pelo seu efeito pró-inflamatório e pró-angiogênico, inclusive no câncer de mama, onde níveis aumentados desta Interleucina estão relacionados a um pior prognóstico (37, 38). Na presença de tumor, a IL-6 inibe a apoptose das células tumorais e, no carcinoma

ductal de mama, foi relacionada com a promoção e a progressão do tumor (39). A responsividade do tumor mamário à IL-6 é diretamente aumentada pela quantidade de RE ou RP presentes no tumor (40). Além disso, mostrou implicação no mecanismo de resistência à hormonioterapia de tumores RE⁺, com consequente associação à progressão da doença e recorrência (41).

Por sua vez, o TNF- α participa da regulação da apoptose e possui ação anti- e pró-tumorigênica (42). Como promotor tumoral, o TNF- α está associado à inflamação crônica e induz o aumento da IL-6 (35). Assim como a IL-6, o TNF- α foi relacionado com a promoção e a progressão do carcinoma ductal de mama. Sua presença no tumor promove o crescimento e a migração tumoral. Níveis séricos elevados de TNF- α são indicadores de pior estágio tumoral e metástase em linfonodos (39). Tanto o TNF- α como a IL-6 estimulam o aumento do estrógeno sérico, intratumoral e no tecido adiposo, o que acelera o crescimento de tumores RE⁺ (40). Esse mecanismo de ação é potencializado pela obesidade, onde o TNF- α e a IL-6 estimulam a atividade da aromatase no tecido adiposo (18, 43).

Quanto à proteína amilóide sérica A (SAA), esta tem sua expressão hepática estimulada pela IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Níveis séricos elevados de SAA estão relacionados com doenças inflamatórias e alguns tumores, onde pode atuar na tumorigênese e na metástase (44).

A inflamação está associada à tumorigênese e a SAA exerce ação quimiotática sobre monócitos, linfócitos e granulócitos, aumentando a inflamação local e predispondo o tecido à malignidade. A SAA induz a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (45). A expressão de SAA em macrófagos associados ao tumor está relacionada com tumores maiores e de maior grau histológico. Em câncer de mama, níveis elevados de SAA estão relacionados a um maior acometimento de linfonodos, assim como a uma maior recorrência e letalidade da doença (46).

Foi observado que a SAA pode estimular a expressão de IL-1 em câncer de mama triplo negativo, que é um subtipo de câncer de mama caracterizado pela ausência de RE, RP e HER2 e classificado como um dos mais agressivos. Tal ação é capaz de aumentar a inflamação, a progressão e a letalidade da doença (47). Nosso grupo observou em mulheres na pós-menopausa e com câncer de mama, a associação entre a obesidade e níveis elevados de SAA em pacientes com tumores RE-, considerados de pior prognóstico (48).

Outro grupo observou a correlação entre a presença de níveis aumentados de SAA e uma maior densidade mamográfica, o que é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. A mesma associação foi feita com níveis elevados de IL-6 e TNF- α (49).

Além disso, já foi avaliada a correlação entre os níveis de SAA e o estadiamento do tumor. Os níveis aumentados de SAA nas neoplasias foram relacionados com um pior prognóstico da doença, inclusive no câncer de mama. Somada à sua ação inflamatória, a SAA age como uma matriz extracelular de adesão de proteínas, oferecendo suporte para a difusão e migração celular, colaborando com a progressão tumoral (50).

Em suma, níveis elevados de SAA podem ser utilizados como um possível marcador de prognóstico desfavorável para diferentes tipos de tumores sólidos, inclusive o de mama (51).

1.4. Microambiente Tumoral e CTNs

Os tumores já foram descritos como lesões que nunca cicatrizam devido às semelhanças entre os mecanismos que propiciam a promoção e a progressão tumoral e a recuperação de um estroma saudável após uma lesão. Nas duas situações, ocorre a superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o que causa o aumento da permeabilidade vascular. Porém, ao contrário do processo cicatricial que tem produção de VEGF momentânea, o estroma tumoral tem produção contínua de VEGF, que induz a permeabilidade vascular crônica, reprograma as células endoteliais para um estado proliferativo e protegido contra a apoptose, além de favorecer a angiogênese, sendo que a soma desses fatores cria um ambiente pró-tumorigênico (52, 53).

A ocorrência da angiogênese e a ação do VEGF são estimuladas pela ação do TNF- α (35) e da IL-1 (54). Além disso, a ação do VEGF pode se associar à IL-6 e influenciar o tratamento do câncer de mama, acarretando uma pior evolução da doença, inclusive com diminuição da sobrevida (55). Já foi observado que a promoção da permeabilidade e do extravasamento vascular pelo VEGF do tumor mamário favorece o surgimento de metástase óssea, pulmonar, hepática e cerebral (56).

Neste contexto, a inflamação crônica assume importante papel, podendo favorecer a gênese tumoral. Inicialmente, citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio causam alterações epigenéticas nas células pré-malignas e silenciam os genes supressores tumorais. A seguir, citocinas e quimiocinas atuam na sobrevivência e na proliferação das células neoplásicas. Macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos recrutados pelos fatores pró-inflamatórios passam a fazer parte do estroma tumoral, onde participam do aumento e da manutenção da inflamação, promovendo o crescimento do tumor e a possibilidade de invasão. Esse ciclo se repete sucessivamente, mantendo a inflamação crônica e favorecendo o tumor (57-60).

Além disso, o microambiente tumoral, rico em citocinas pró-inflamatórias, pode proporcionar o surgimento de células tronco neoplásicas (CTNs) (61, 62). As CTNs são assim denominadas pelas suas características semelhantes às células tronco normais, como a capacidade de autorrenovação, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, inibição da apoptose e a habilidade de migrar, que no caso das CTNs, implica em gerar metástase (63).

O termo CTN se propagou a partir de 2001 através do estudo de células de leucemia mieloide aguda e, recentemente, foi comprovado um importante papel desempenhado pelas CTNs na promoção do câncer: a sua capacidade de proporcionar a reincidência (64-66). As CTNs podem se originar a partir de células somáticas que se tornaram desdiferenciadas ou a partir de células tronco normais que sofreram mutação (67) e têm sido encontradas em vários tipos de tumores sólidos, incluindo pâncreas (68), fígado (69), pituitária (70), colorretal (71), pulmão (72), rim (73), cérebro (74), próstata (75) e mama (76).

Esse processo de desdiferenciação foi verificado em detalhes em ratos utilizando-se células de carcinoma pulmonar humano, que ao receberem o estímulo de IL-6 produzido pelas células estromais passaram por desdiferenciação e se tornaram CTNs (77).

Foi observado que as CTNs podem interagir com células endoteliais e estromais através de moléculas como a quinase de adesão focal (FAK, do inglês *focal adhesion kinase*) causando metástase óssea. Já foi verificado que a IL-6 e a IL-1 elevam a expressão de FAKs em CTNs mamárias, contribuindo para a ocorrência de metástase desse tipo de tumor (78, 79).

A glicoproteína de membrana CD44, ao ser ativada pelo ácido hialurônico, seu ligante principal, atua em várias vias de sinalização celular responsáveis pela modulação do citoesqueleto, da motilidade, da proliferação e da sobrevivência celular. Essa glicoproteína é bastante expressa em células epiteliais, mesenquimais e hematopoiéticas, incluindo alguns tipos de CTNs e, no câncer de mama, já foi relacionada com a proliferação celular, a progressão do tumor, à ocorrência de metástase e a resistência a alguns agentes quimioterápicos. Tendo em vista os diferentes mecanismos de ação da glicoproteína CD44 no câncer, ela tem sido considerada um possível marcador prognóstico (80, 81).

As moléculas de superfície das CTNs mamárias costumam ter a seguinte característica: alta expressão de CD44 (CD44^{high}), não apresentam ou expressam baixa quantidade de CD24 (CD24^{-low}) e altas concentrações da enzima aldeído desidrogenase (ALDH1) (82, 83). Além disso, as CTNs não expressam marcadores de linhagem (*lineage*⁻), tais como CD3, CD10, CD16, CD18, CD64 e CD140b (84).

Além da expressão elevada de CD44, as CTNs mamárias também podem possuir uma grande quantidade de antígeno epitelial específico (ESA) em sua superfície, que indica alto potencial tumorigênico e acarreta um pior prognóstico (85).

A presença de CTNs em espécimes cirúrgicos de tumores mamários é associada a prognóstico desfavorável. Altos níveis de CTNs, identificadas pelo fenotipo ESA⁺/CD44⁺/CD24^{-low} (86, 87) e alta expressão da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (88) predizem resultado clínico desfavorável para pacientes com câncer de mama (89–91). Ressecções cirúrgicas de pacientes com carcinoma ductal invasivo, após quimioterapia, mostraram que pacientes que apresentaram células CD44⁺/CD24^{-low} em seus tumores tiveram uma sobrevida global mais reduzida, sugerindo associação das CTNs com recidiva nestes pacientes (92).

Evidências crescentes sugerem também que CTNs mamárias são resistentes à quimio e à radioterapia. Células de câncer mamário CD44^{high}/CD24^{-low}/ESA⁺ mostraram maior resistência a agentes quimioterápicos (paclitaxel e 5-fluorouracil) quando comparadas às células tumorais presentes na massa do tumor (93).

Estudos anteriores demonstraram que a enzima ALDH1 também pode ser utilizada para identificar CTNs mamárias e, além disso, essa enzima já foi identificada como um fator prognóstico independente indicativo de sobrevida livre de

doença e sobrevida global em câncer de mama triplo negativo (94, 95). A expressão da ALDH1 também foi associada ao grau histológico, ao tamanho do tumor e ao estadiamento TNM, demonstrando ser um fator de pior prognóstico para o câncer de mama de uma maneira geral (96, 97).

Outra proteína importante é o fator de transcrição Oct4 (*Octamer-binding Transcription Factor 4*), que inicialmente foi relacionado com a capacidade de autorrenovação de células-tronco embrionárias indiferenciadas e, em estudos mais recentes, foi observado em células teciduais adultas que também possuíam características de células tronco, dentre elas as CTNs mamárias. Já foi observada elevada expressão de Oct4 em células tumorais CD44⁺/CD24⁻, o que levou à sua proposição como um biomarcador do câncer de mama (98).

Pelo nosso conhecimento, até o momento não existem estudos que abordam, simultaneamente, as relações entre inflamação subclínica decorrente da obesidade, a presença de CTNs e as características clinicopatológicas de pior prognóstico no câncer de mama. Desta forma, o conjunto dos resultados da presente investigação traz contribuição para a área.

2. OBJETIVOS

Investigar a expressão de marcadores de CTNs em microarranjos teciduais de espécimes cirúrgicos de pacientes submetidas ao tratamento cirúrgico do câncer de mama, e sua associação com as características clinicopatológicas da doença, com marcadores inflamatórios (séricos e teciduais), com a obesidade e com parâmetros bioquímicos associados a ela.

2.1. Objetivos Específicos

1. Comparar as frequências de expressões de marcadores de CTNs, de proliferação e de inflamação entre os diferentes microarranjos de tecidos (*tissue microarray* – TMA) no grupo total e entre os grupos de pacientes não obesas (NO) e sobrepeso/obesidade (SP/O).
2. Avaliar a correlação das frequências de expressão de marcadores de CTNs, de proliferação e de inflamação nos diferentes TMAs com o perfil lipídico e com a glicose das pacientes
3. Avaliar a correlação das frequências de expressão de marcadores de CTNs, de proliferação e de inflamação nos diferentes TMAs com as concentrações séricas dos indicadores de inflamação subclínica: IL-6, TNF- α , SAA.
4. Avaliar a associação das frequências de expressão de marcadores de CTNs, de proliferação e de inflamação com as características clinicopatológicas da doença, nos diferentes TMAs.
5. Avaliar a influência dos marcadores teciduais e séricos na sobrevida livre de doença (SLD) das pacientes.
6. Avaliar a influência dos marcadores teciduais e séricos na sobrevida global (SG) das pacientes.

3. MÉTODOS E CASUÍSTICA

3.1. Desenho do Estudo

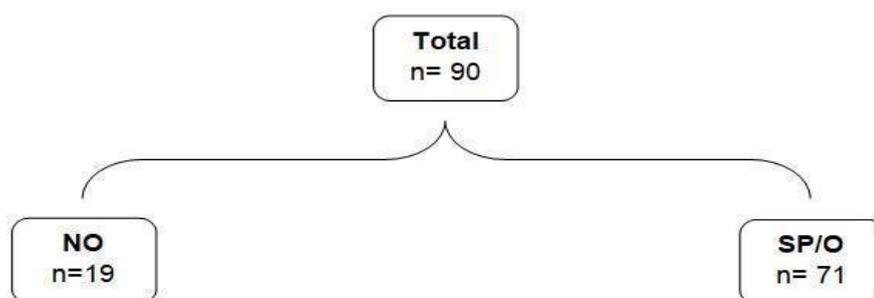
O estudo foi do tipo retrospectivo e derivado de investigação anterior, realizada no período entre 2009 e 2014, por ocasião do tratamento cirúrgico do câncer de mama (carcinoma ductal invasivo – CDI) de participantes recém-diagnosticadas e sem tratamento prévio. No dia da cirurgia, além da obtenção dos dados demográficos e antropométricos das participantes, foram realizadas coletas de sangue para quantificação de parâmetros bioquímicos (colesterol total e frações; triglicerídeos; glicose) e indicadores inflamatórios séricos (IL-6, TNF- α e SAA). Posteriormente, foram construídos microarranjos teciduais (*tissue microarray* – TMA) a partir de blocos de parafina de espécimes cirúrgicos das pacientes, com vistas à pesquisa da expressão dos marcadores teciduais de inflamação IL-6, TNF- α e SAA. Na ocasião foram também coletadas as características clinicopatológicas das pacientes, a partir de seus prontuários.

O estudo atual abrangeu novas análises nos TMAs construídos anteriormente, bem como a coleta, em banco de dados relacionado, dos resultados dos indicadores inflamatórios séricos, das frequências de expressão tecidual de IL-6, TNF- α e SAA e dos exames bioquímicos. Além disso, incluiu a coleta de dados demográficos, antropométricos e das características clinicopatológicas das pacientes do estudo anterior.

3.2. Tamanho Amostral

O tamanho da amostra foi constituído por 2 conjuntos de TMAs procedentes de 90 pacientes oriundas do estudo anterior, no qual a inclusão foi realizada por conveniência. Todas tiveram as concentrações de IL-6, TNF- α , SAA e parâmetros bioquímicos determinados no pré-operatório e foram procedentes, por ocasião do tratamento cirúrgico, dos ambulatórios de Patologia Mamária e Oncologia Clínica do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As pacientes foram classificadas em dois grupos, conforme

demonstrado no Esquema 1: grupo de não obesas (NO) com $IMC \geq 18,5 \leq 24,99$ kg/m^2 e $CA \leq 88$ cm, e grupo sobrepeso/obesidade (SP/O), composto por pacientes com $IMC \geq 25$ kg/m^2 e circunferência abdominal (CA) > 88 cm. No último grupo também foram incluídas 13 participantes que tiveram um dos dois critérios: $IMC \geq 25$ kg/m^2 ou $CA > 88$ cm.



Esquema 1: Agrupamento das pacientes em estudo: grupos NO e SP/O

3.3. Coleta de Dados

Foi realizada coleta de dados a partir de banco de dados geral das pacientes com câncer de mama, em fase pré- ou pós-menopausa incluídas no estudo, no período de 2009 a 2014. Dados que foram coletados: idade, etnia, IMC, CA, tempo de menopausa, tipo histológico da neoplasia, grau de diferenciação, estadiamento clinicopatológico, *status* de receptores hormonais (receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP)), do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e concentrações no pré-operatório de IL-6, TNF- α , SAA e de parâmetros bioquímicos (colesterol total (Col-T) e frações (LDL-Col, HDL-Col), triglicerídeos (TG) e glicose (Gli)).

3.4. Critérios de Seleção

3.4.1. Inclusão

Os critérios de inclusão para o grupo SP/O foram: câncer de mama, estado pré- ou pós-menopausa, $IMC \geq 25$ kg/m^2 , $CA > 88$ cm e que aceitaram participar do estudo proposto. Os critérios de inclusão para o grupo de NO foram: câncer de mama, estado pré- e pós-menopausa, $IMC \geq 18,5 \leq 24,99$ kg/m^2 , $CA \leq 88$ cm, e que aceitaram participar do estudo proposto.

3.4.2. Exclusão

Foram excluídas da casuística as pacientes: 1) com IMC < 18,5 kg/m², 2) que tinham recebido tratamento quimioterápico e/ou radioterápico prévio, 3) que tinham outro tipo de câncer associado, 4) com sinais clínicos e/ou relato de infecções ou inflamações agudas, 5) relato de doença autoimune; 6) relato de doenças pulmonares crônicas; 7) aquelas que não aceitaram participar do estudo proposto.

3.5. Construção dos Microarranjos de Tecidos - *Tissue Microarray* (TMA)

A presente investigação foi realizada em microarranjos teciduais (TMA - do inglês *Tissue Microarray*), que já estavam prontos. Estes foram construídos conforme segue. Primeiramente, foi feito um inventário do material de estudo proveniente de peças cirúrgicas obtidas por mastectomia ou quadrantectomia, fixadas em formalina e incluídas em blocos de parafina arquivados no Departamento de Anatomia Patológica/FCM/UNICAMP (Figura 1). Foram selecionadas as lâminas histológicas originais de cada paciente, coradas rotineiramente com hematoxilina e eosina (H&E), e os respectivos blocos de parafina contendo as áreas de interesse: tecido tumoral (TU) e parênquima não tumoral (NT) da margem da peça cirúrgica, evitando áreas de hemorragia e necrose. Após a marcação das áreas selecionadas, em duplicatas (99), nas lâminas histológicas, as mesmas áreas correspondentes foram marcadas nos blocos de parafina (Figura 1). Foram realizadas perfurações em duplicatas, das duplicatas marcadas nos blocos, com agulhas do aparelho de TMA (*Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA*), na espessura de 1,0 µm. Os cilindros de tecidos foram retirados e ordenados sobre o bloco receptor, com distância de 0,2 mm entre si. A confecção do TMA foi realizada com o *Manual Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA)*. Foram realizados cortes histológicos em lâminas embebidas por cola específica, submetidas à fixação por UV (*Instrumedics Inc®*, *Hackensack, NJ, EUA*) e recobertas com adesivo, para impedir a movimentação do tecido durante a técnica. Posteriormente, as lâminas sofreram um banho de parafina e foram armazenadas em freezer a -20 °C, até o momento do uso para a reação imunoistoquímica. A Figura 2 esquematiza todas as etapas do processo.



Figura 1: Blocos e lâminas pareadas e demarcadas nas áreas de interesse para confecção do TMA.

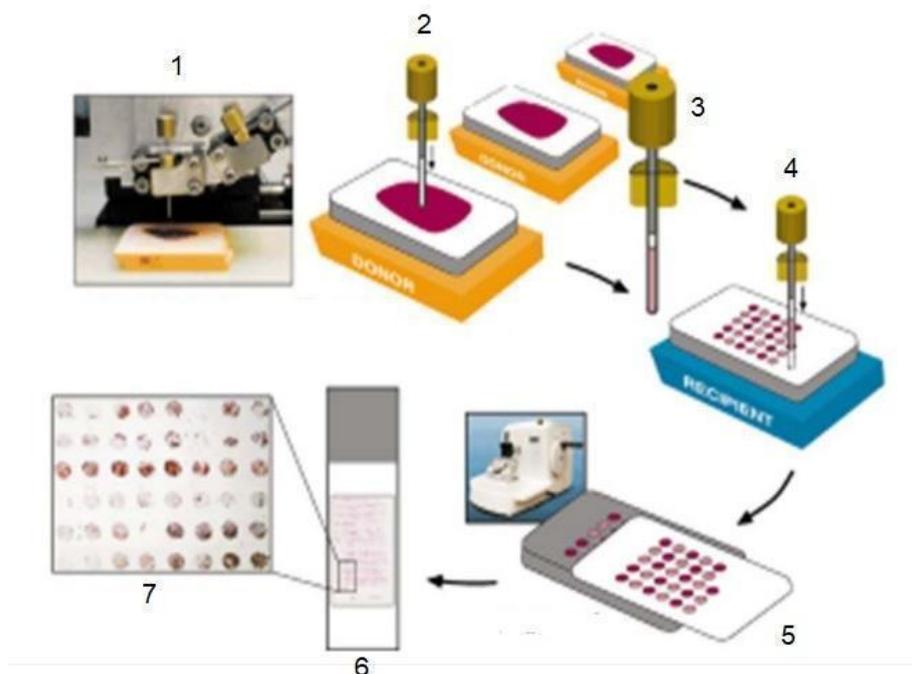


Figura 2: Esquema de construção de blocos e obtenção de cortes de microarranjo tecidual (*tissue microarray* - TMA): 1) bloco histológico de parafina (doador) no equipamento perfurador; 2) perfuração da área de interesse do bloco doador; 3) transferência da amostra tecidual; 4) inserção da amostra tecidual no bloco receptor para a confecção do TMA; 5) corte do bloco receptor pelo micrótomo (TMA); 6) corte fixado na lâmina; 7) visualização de detalhe da lâmina do TMA após a reação imunoistoquímica. Adaptado de Kalantari e Madjd, 2014 (100).

3.6. Análise imunoistoquímica para investigação da expressão dos marcadores das CTNs, de proliferação e de inflamação

Após a obtenção das lâminas de TMA, estas foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes (100, 80, 50%) e lavadas com água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos em água oxigenada a 10 volumes, cada um com duração de 3 minutos, seguida de lavagem em água destilada. Para recuperação antigênica foi utilizada a panela a vapor Pascal Dako, com o objetivo de expor os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 6,0, a 95°C, durante 30 minutos. Em seguida, foram resfriadas em temperatura ambiente durante 20 minutos e lavadas em água destilada. Após esta etapa, os cortes histológicos foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico, nas diluições padronizadas, a 4°C, *overnight*. Os anticorpos que foram utilizados encontram-se listados no Quadro 1. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, sob agitação (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 a 7,6). Posteriormente foram incubadas com *Novo Link™ Max Polymer Detection System* (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), a 37°C, durante 1 hora e, a seguir, submetidas a três lavagens com PBS, sob agitação. Após a incubação, a revelação foi feita com substrato cromogênico DAB (3'-diaminobenzidine) (código D5637, SIGMA, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) na proporção: 0,06g DAB:100ml PBS: 500µl água oxigenada a 3%:1 ml dimetilsulfóxido (DMSO), a 37°C, durante 5 minutos, exceto para os marcadores anti-ALDH1 e anti-Ki-67, que utilizaram em sua revelação o kit da Novolink/Novocastra. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água corrente e contra coradas com hematoxilina de Harris, durante 30 a 60 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizados em três banhos de xilol para, a seguir, serem montados com lamínula e resina *Entellan®* (Merck, Darmstadt, Alemanha). Seções seriadas de cada tumor, não incubadas com o anticorpo primário, foram utilizadas como controles negativos. Os controles positivos adequados para cada marcador foram realizados a cada bateria de coloração.

Quadro 1. Características dos anticorpos anti-marcadores de CTNs, de proliferação celular e de inflamação.

Anticorpos	Clone	Origem (host)	Fabricante	Diluição	Local da reação	Controle (+)
Anti-ALDH1	ab52492	coelho	Abcam	1:100	citoplasma	carcinoma de cólon
Anti-CD44	MRQ-13	rato	Sigma-Aldrich	1:250	citoplasma e/ou membrana	fígado
Anti-IL-6	ab6672 policlonal	coelho	Abcam	1:100	citoplasma	fígado
Anti-Ki-67	MA5-14520 (SP6)	coelho	Invitrogen	1:50	núcleo	mama normal
Anti-Oct4	GT486	camundongo	Abcam	1:100	núcleo	células tronco embrionárias
Anti-SAA	115 /ab687	camundongo	Abcam	1:500	citoplasma	fígado
Anti-TNF-α	2C8	camundongo	Novus Biologicals	1:100	citoplasma e/ou membrana	linfonodo

3.7. Leitura e interpretação das reações imunoistoquímicas

As leituras das lâminas de IL-6, TNF- α e SAA foram feitas pela patologista Dra. Luciana Regina Moreira, do Laboratório de Citopatologia do CAISM. As leituras das demais lâminas foram realizadas pelo Prof. Dr. André Almeida Schenka, do Departamento de Farmacologia da FCM. Ambos utilizaram microscópio Nikon, E200, sob aumento de 200x e todas as leituras foram realizadas sem acesso às informações clinicopatológicas das pacientes (estudo cego).

A interpretação das análises imunoistoquímicas foi realizada a partir de dois parâmetros: intensidade da reação e porcentagem de células reativas, conforme especificado na Tabela 1. Tendo em vista que as lâminas de TMA foram confeccionadas em duplicata, após a análise dos dois resultados obtidos, foi utilizado o maior valor de somatória dos escores (% + intensidade), de acordo com o método apresentado nos trabalhos de Makretsov et al., 2003 e Fadare et al., 2014 (101, 102).

As Figuras 3 e 4 são exemplos das reações imunoistoquímicas, onde a primeira demonstra a reação citoplasmática no epitélio e no estroma e a segunda apresenta um exemplo de reação nuclear.

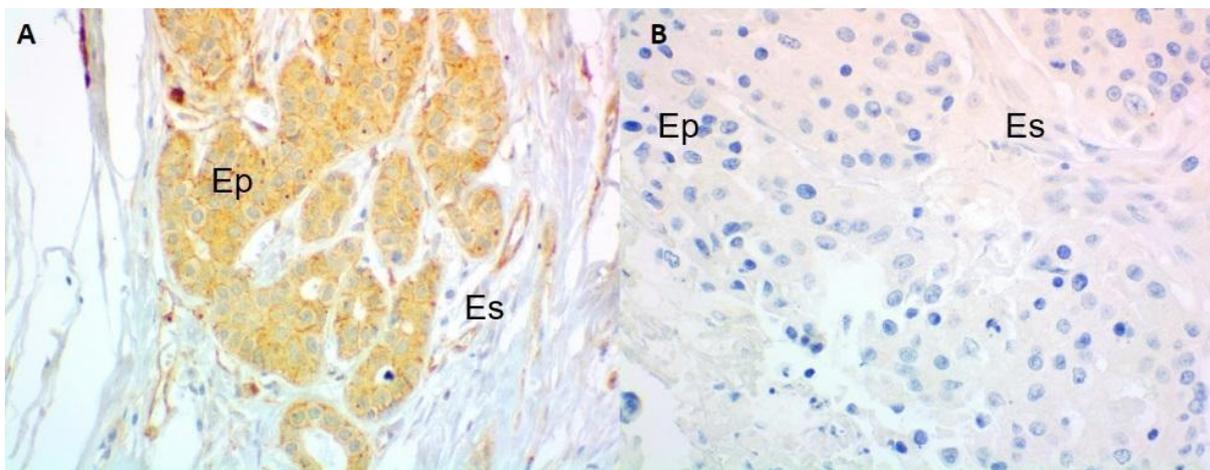


Figura 3: Exemplo de reação imunoistoquímica citoplasmática em carcinoma invasivo. Ep: epitélio, Es: estroma. Marcador de CTN CD44. A: positivo, B: negativo

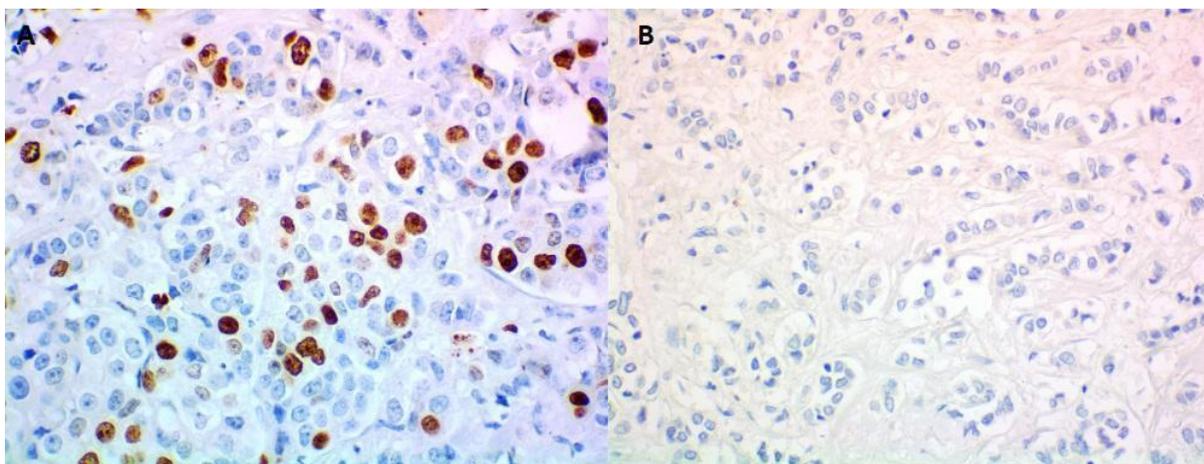


Figura 4: Exemplo de reação imunoistoquímica nuclear em carcinoma invasivo. Marcador de proliferação Ki-67. A: positivo, B: negativo

Tabela 1 – Escores finais obtidos pela análise simultânea dos parâmetros: intensidade de reação e porcentagem de células reativa

% de células reativas	Intensidade da reação			
	0 (negativo)	1 (leve)	2 (moderado)	3 (intenso)
0	0			
1 (<10)		2	3	4
2 (10 a 50)		3	4	5
3 (>50)		4	5	6

Os escores da expressão proteica tecidual dos marcadores de CTNs e de inflamação foram também transformados em variáveis dicotômicas para a execução de parte da análise estatística. Positivo (representado pelo número 1): presença de expressão da proteína de interesse variando do escore 2 a 6. Negativo (representado pelo número 2): ausência das proteínas de interesse ou expressão muito fraca, variando do escore 0 a 1, tendo em vista a metodologia utilizada no trabalho de Bachmann et al., 2006 (103). Para o marcador de proliferação Ki-67, as variáveis dicotômicas (1 e 2) foram estabelecidas a partir do *cutoff* de 20%, de acordo com Goldhirsch et al., 2013 (104), onde 1 representa a expressão maior do que 20% e 2 significa uma expressão menor ou igual a esse valor. Todas as variáveis dicotômicas estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação das variáveis dicotômicas

Marcadores	Variável	Conceito	Escore
CTNs e Inflamação	1	Positivo	2 a 6
	2	Negativo a muito fraco	0 a 1
Proliferação (Ki-67)	1	>20%	na
	2	≤20%	na

na= não se aplica

3.8. Classificação dos Subtipos Moleculares

No presente estudo, os subtipos moleculares foram categorizados em: luminal, luminal HER, HER e triplo negativo. O subtipo luminal abrangeu tumores luminal A e luminal B não-HER2.

3.9. Análise Estatística

Para comparação das variáveis categóricas entre grupos foram utilizados os testes Qui-Quadrado ou exato de *Fisher*. Para comparação das variáveis numéricas entre grupos, devido à ausência de distribuição normal das variáveis, foi utilizado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* (2 grupos). Para as análises de correlação foram realizadas pelo teste de *Spearman*.

Para análise de sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) foi utilizado o método de Kaplan-Meier, com comparação entre curvas pelo teste log-rank. Para avaliação dos fatores associados com a SLD e a SG foi utilizada a análise de regressão de Cox, simples e múltipla, com critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Para a regressão de Cox foi utilizado o modelo *Classical Method of Maximum Likelihood* e as estimativas foram obtidas pelo *Wald test (Analysis of Maximum Likelihood Estimates)*. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico *The SAS System for Windows* versão 9.4. (*Statistical Analysis System - SAS Institute Inc, 2002-2012, Cary, NC, USA*) (105, 106). O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

3.10. Aspectos Éticos

Todos os procedimentos necessários para a realização deste estudo estão de acordo com a resolução 466/12 e foram previamente analisados e 34 aprovados pelo CEP/UNICAMP (Parecer CEP: 3.806.097; CAAE: 25526819.6.0000.5404).

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais da população estudada

Os grupos investigados mostraram-se bastante homogêneos em termos de característica demográfica (idade), análises bioquímicas, inflamatórias e características clinicopatológicas, com valores de p não significativos na maioria dos parâmetros comparados, conforme apresentado na Tabela 3.

Como era esperado, houve diferença estatisticamente significativa em relação ao índice de massa corpórea (IMC) e à circunferência abdominal (CA), variáveis que foram utilizadas para a classificação dos grupos. Vale destacar a presença de níveis de triglicérides mais elevados, bem como maiores concentrações séricas de IL-6 e SAA entre as constituintes do grupo sobrepeso/obesidade (SP/O). Também pode se observar a tendência de níveis mais baixos de HDL-Col no grupo SP/O.

O estado menopausal foi bastante semelhante entre os grupos, havendo praticamente a mesma frequência de mulheres na pré- e pós-menopausa em ambos.

Em relação às características clinicopatológicas, tanto mulheres não obesas (NO) quanto aquelas com SP/O apresentaram maior frequência de estadiamento clinicopatológico II (Ec_p , II) e tumores RE^+ , RP^+ e $HER2^-$. Da mesma forma, a classificação dos tumores quanto ao subtipo molecular, demonstrou frequências semelhantes entre os grupos.

Tabela 3 – Dados demográficos, antropométricos, bioquímicos, inflamatórios e clinicopatológicos das participantes, com comparação entre os grupos NO e SP/O.

	TOTAL ^an= 90	NO n= 19	SP/O ^an= 71	p
Idade (anos) ^b	50 (44-60)	47 (43-68)	51 (44-59)	0,9527
IMC (kg/m ²)	28,7 (24,3-32,3)	22,0 (21,1-23,2)	30,1 (27,4-32,6)	< 0,0001
CA (cm)	94,5 (88-102)	84 (79-86)	98 (92-103)	< 0,0001
Col-T (mg/dL)	187 (159-207)	179 (147-212)	187 (159-206)	0,9291
LDL-Col (mg/dL)	116 (93-133)	106 (89-146)	116 (93-132)	0,9724
HDL-Col (mg/dL)	45 (37-56)	52 (43-63)	44 (37-53)	0,0710
TG (mg/dL)	95 (68-146)	70 (57-113)	100 (70-148)	0,0292
Glicose (mg/dL)	88 (78-98)	86 (76-89)	90 (78-99)	0,0947
IL-6 (pg/mL)	1,5 (0,89-2,35)	0,89 (0,50-2,07)	1,63 (1,11-3,11)	0,0111
TNF- α (pg/mL)	3,96 (3,11-5,44)	3,28 (2,14-4,29)	4,59 (3,38-5,72)	0,1000
SAA (mg/mL)	3,48 (2,08-6,58)	2,42 (1,50-3,87)	3,87 (2,20-7,0)	0,0055
Estado				
Menopausal (n (%)) ^c				
Pré-menopausa	43 (47,8)	10 (52,6)	33 (46,5)	0,7967
Pós-menopausa	47 (52,2)	9 (47,4)	38 (53,5)	
Ecp (n (%))				
I	23 (25,6)	6 (31,6)	17 (23,9)	
II	40 (44,4)	11 (57,9)	29 (40,8)	0,1127
III	27 (30,0)	2 (10,5)	25 (35,2)	
RE (n (%))				
Positivo	66 (73,3)	15 (78,9)	51 (71,8)	0,7709
Negativo	24 (26,7)	4 (21,1)	20 (28,2)	
RP (n (%))				
Positivo	56 (62,2)	13 (68,4)	43 (60,6)	0,6026
Negativo	34 (37,8)	6 (31,6)	28 (39,4)	
HER2 (n (%))				
Positivo	30 (33,3)	6 (31,6)	24 (33,8)	1,0
Negativo	60 (66,7)	13 (68,4)	47 (66,2)	
Subtipos				
Moleculares (n (%))				
Luminal	51 (56,7)	12 (63,1)	39 (54,9)	0,8557
Luminal HER	16 (17,8)	3 (15,8)	13 (18,3)	
HER	14 (15,6)	3 (15,8)	11 (15,5)	
Tripla Negativo	9 (10,0)	1 (5,3)	8 (11,3)	

Grupo SP/O: IMC ≥ 25 kg/m² e/ou CA >88 cm; Grupo NO: IMC $\geq 18,5$ a $\leq 24,99$ kg/m² e CA ≤ 88 cm. ^a Houve variação do "n" TOTAL e no grupo SP/O, para as variáveis IL-6 e TNF- α (n= 65 TOTAL e 46 SP/O) e SAA (n= 88 TOTAL e 69 SP/O). Valores de referência para os parâmetros bioquímicos: Col-T: < 190 mg/dL; LDL-Col: ≤ 100 mg/dL; HDL-Col: ≥ 50 mg/dL (mulheres); TG: < 150 mg/dL; Glicose: < 100 mg/dL. Ecp: estadiamento clinicopatológico, com base no sistema TNM (T: extensão do tumor primário; N: ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais; M: ausência ou presença de metástase à distância). ^b Dados expressos como mediana e IQR (variação interquartil); comparações realizadas pelo teste de Mann-Whitney. ^c Dados expressos como frequências absoluta (n) e relativa (%), analisados pelo teste Qui-quadrado ou exato de Fisher. * Nível de significância adotado: 5% (p < 0,05).

4.2. Frequência dos marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs), de proliferação e de inflamação nos microarranjos de tecido tumoral (TU) e não tumoral (NT) da população estudada

A Tabela 4, a seguir, reúne as análises comparativas das frequências de expressão de todos os marcadores teciduais entre os microarranjos tumorais (TU) e não tumorais (NT) no grupo total de mulheres.

Na presente investigação, foram incluídos microarranjos teciduais (TMA) de 90 mulheres, porém, devido às dificuldades da etapa de fixação dos cortes de TMA nas lâminas (e mesmo com a realização da técnica em duplicata), nem sempre houve material íntegro correspondente aos espécimes cirúrgicos de todas as pacientes, principalmente nas lâminas de parênquima não tumoral (NT). Esta limitação técnica impossibilitou a análise de alguns marcadores para a totalidade dos casos. Apesar da reação imunoistoquímica ter sido realizada na lâmina como um todo, a ausência total ou parcial do tecido, na área correspondente ao espécime cirúrgico de uma determinada paciente, influenciou a composição final da amostra de estudo, tendo sido determinado um “novo n” ($n^{\text{viável}}$) para a análise de cada marcador.

Nas leituras das lâminas dos marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs) ALDH1 e CD44, nos dois tipos de amostras, tumoral (TU) e não tumoral (NT), foram avaliadas tanto as células do epitélio (Ep) quanto as do estroma (Es), composto por macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais vasculares (vide Figura 3).

Conforme se verifica na Tabela 4, a expressão do marcador de CTNs ALDH1 no epitélio (ALDH1Ep) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os microarranjos dos tecidos tumoral (TU) e não tumoral (NT), cujas frequências foram respectivamente 25% e 9% ($p = 0,0114$). Também foi encontrada diferença estatisticamente significativa na detecção estromal de ALDH1 (ALDH1Es) entre os espécimes TU e NT (84,1% vs 64,2%, $p = 0,0044$).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão do marcador de CTNs CD44 (do epitélio ou do estroma) entre os microarranjos TU e NT. Foi possível notar a alta frequência de expressão deste marcador em ambos os

tipos de tecido, que foi localizado em mais de 76% das células epiteliais e mais de 67% dos componentes estromais.

Com relação ao marcador de CTNs Oct4, observou-se frequência diferencial de expressão entre os espécimes de tecido TU e NT, com positividade de 9,8% e 43,9%, respectivamente, o que caracterizou uma reatividade acima de 4 vezes nas amostras de NT em relação às de TU ($p < 0,0001$).

O marcador de proliferação celular Ki-67 também apresentou resultados com diferença de expressão estatisticamente significativa entre os tecidos TU e NT. A presença desse marcador foi observada em 56,8% dos espécimes de tecido tumoral e somente em 1,2% dos NT ($p < 0,0001$), correspondendo a uma frequência de expressão 47,3 vezes maior nos espécimes TU.

Os marcadores inflamatórios IL-6 e TNF- α não mostraram expressão diferencial entre os espécimes NT e TU (Tabela 4). Os dois marcadores foram detectados em alta porcentagem de ambos os tipos de tecido, com o primeiro apresentando presença em mais de 75% das amostras, enquanto o segundo foi encontrado em 100% das amostras.

Em contrapartida, a SAA, que também é um marcador inflamatório, apresentou expressão diferencial entre os tecidos, tendo sido detectada em 44,7% dos TU e em 84,3% dos NT ($p < 0,0001$) ou seja, praticamente o dobro de espécimes NT demonstraram a sua expressão, conforme dados também apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Frequência dos marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs), de proliferação e de inflamação nos microarranjos de tecido tumoral (TU) e não tumoral (NT) do grupo total de pacientes

	Microarranjos Teciduais				<i>p</i>
	TU		NT		
	<i>n</i> ^{viável}	<i>n</i> (%) [*]	<i>n</i> ^{viável}	<i>n</i> (%)	
Marcadores					
CTNs					
ALDH1					
Epitélio	88	22 (25,0)	67	6 (9,0)	0,0114
Estroma	88	74 (84,1)	81	52 (64,2)	0,0044
CD44					
Epitélio	84	64 (76,2)	67	53 (79,1)	0,6996
Estroma	84	57 (67,9)	82	55 (67,1)	1,0000
Oct4	82	8 (9,8)	82	36 (43,9)	< 0,0001
Proliferação					
Ki-67	88	50 (56,8)	81	1 (1,2)	< 0,0001
Inflamação					
IL-6	86	69 (80,2)	69	52 (75,4)	0,5587
TNF- α	83	83 (100)	73	73 (100)	1,0000
SAA	85	38 (44,7)	70	59 (84,3)	< 0,0001

*Dados expressos como frequência absoluta (*n*) e relativa (%) de positividade nas amostras totais viáveis (*n*^{viável}), de acordo com a classificação dicotômica, descrita na Tabela 2. Microarranjos teciduais (TMAs) realizados para diferentes regiões do espécime cirúrgico: tecido tumoral: TU, tecido não tumoral: NT. Análises realizadas pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.3. Comparação das Frequências dos Marcadores de Células Tronco Neoplásicas (CTNs), de Proliferação e de Inflamação nos Microarranjos de Tecido Tumoral (TU) e Não Tumoral (NT) entre os Grupos de Pacientes Não-obesas (NO) e Sobrepeso/obesidade (SP/O)

A frequência de expressão de marcadores de CTNs (ALDH1, CD44 e Oct4), de proliferação (Ki-67) e de inflamação (IL-6, TNF- α e SAA), tanto nos espécimes TU quanto NT, foi bastante semelhante entre os grupos NO e SP/O, não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa, conforme se verifica na Tabela 5.

4.4. Avaliação da Correlação das Frequências dos Marcadores de CTNs, de Proliferação e de Inflamação com parâmetros bioquímicos, demográficos e antropométricos das pacientes.

A avaliação das correlações dos escores de expressão dos marcadores de CTNs (ALDH1, CD44 e Oct4), de proliferação (Ki-67) e de inflamação (IL-6, TNF- α e SAA), tanto no tecido TU quanto no NT, com o perfil lipídico e com as concentrações de glicose das pacientes encontrou resultado estatisticamente significativo ao analisar a expressão dos seguintes marcadores no tecido tumoral (TU): os escores de expressão de ALDH1 no estroma (Es) correlacionaram-se com os níveis de glicose ($r = 0,22$; $p = 0,0377$); os escores de expressão de TNF- α com os níveis de colesterol total ($r = 0,22$; $p = 0,0443$) e de LDL-colesterol ($r = 0,24$; $p = 0,0316$); e os escores de expressão de SAA correlacionaram-se inversamente com os níveis de glicose ($r = -0,28$; $p = 0,0091$), conforme demonstrado na Tabela 6.

Além disso, houve detecção de correlações de expressão no tecido tumoral (TU), tanto de CD44 no epitélio (Ep), como de Oct4, com as variáveis idade e com o tempo decorrido desde a menopausa, respectivamente para CD44 Ep ($r = 0,22$; $p = 0,0411$) e ($r = 0,50$; $p = 0,0006$) e para Oct4 ($r = 0,32$; $p = 0,0034$) e ($r = 0,35$; $p = 0,0269$). Ainda em relação ao tecido tumoral, observou-se correlação entre os escores de expressão de SAA TU e o tempo de menopausa ($r = 0,38$; $p = 0,0128$).

Em relação à expressão de marcadores no tecido NT, foram observadas correlações positivas dos escores de reatividade de ALDH1Es (estroma) NT com a idade das pacientes ($r = 0,24$; $p = 0,0282$) e dos escores de SAA NT com as medidas de circunferência abdominal ($r = 0,27$; $p = 0,0220$).

Tabela 5 – Comparação das Frequências dos Marcadores de Células Tronco Neoplásicas (CTNs), de Proliferação e de Inflamação nos microarranjos de tecido tumoral (TU) e não tumoral (NT) entre os grupos de pacientes NO e SP/O.

Marcadores	TU				<i>p</i>	NT				<i>p</i>
	NO n= 19		SP/O n= 71			NO n= 19		SP/O n= 71		
	n ^{viável}	n (%) [*]	n ^{viável}	n (%)		n ^{viável}	n (%) [*]	n ^{viável}	n (%)	
CTNs										
ALDH1										
Epitélio	19	6 (31,6)	69	16 (23,2)	0,5509	17	1 (5,9)	50	5 (10,0)	1,0
Estroma	19	15 (78,9)	69	59 (85,5)	0,4909	19	12 (63,2)	62	40 (64,5)	1,0
CD44										
Epitélio	19	13 (68,4)	65	51 (78,5)	0,3728	16	11 (68,8)	51	42 (82,4)	0,2952
Estroma	19	15 (78,9)	65	42 (64,6)	0,2784	18	11 (61,1)	64	44 (68,8)	0,5778
Oct4	19	3 (15,8)	63	5 (7,9)	0,3791	18	9 (50,0)	64	27 (42,2)	0,5989
Proliferação										
Ki-67	19	12 (63,2)	69	38 (55,1)	0,6071	18	0 (0,0)	63	1 (1,6)	1,0
Inflamação										
IL-6	19	16 (84,2)	67	53 (79,1)	0,7529	14	9 (64,3)	55	43 (78,2)	0,3092
TNF- α	19	19 (100)	64	64 (100)	1,0	18	18 (100)	55	55 (100)	1,0
SAA	19	10 (52,6)	66	28 (42,4)	0,4464	16	13 (81,3)	54	46 (85,2)	0,7051

*Dados expressos como frequência absoluta (n) e relativa (%) de positividade nas amostras totais viáveis (n^{viável}), de acordo com a classificação dicotômica, descrita na tabela 2. Microarranjos teciduais (TMAs) realizados para diferentes regiões do espécime cirúrgico: tecido tumoral: TU, tecido não tumoral: NT. Análises realizadas pelo teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Correlações dos escores de expressão de marcadores teciduais com dados demográficos, antropométricos, bioquímicos e inflamatórios séricos das participantes

	MARCADORES TECIDUAIS									
	TU						NT			
	ALDH1 Epitélio	ALDH1 Estroma	CD44 Epitélio	Oct4	IL6 TU	TNF- α TU	SAA TU	ALDH1 Estroma	CD44 Epitélio	SAA NT
Idade			$r^a = 0,22$ $p = 0,0411$ $n^b = 84$	$r = 0,32$ $p = 0,0034$ $n = 82$				$r = 0,24$ $p = 0,0282$ $n = 81$		
Tempo de Menopausa			$r = 0,50$ $p = 0,0006$ $n = 43$	$r = 0,35$ $p = 0,0269$ $n = 41$			$r = 0,38$ $p = 0,0128$ $n = 42$			
Circunferência Abdominal										$r = 0,27$ $p = 0,0220$ $n = 70$
Col-T						$r = 0,22$ $p = 0,0443$ $n = 83$				
LDL-Col						$r = 0,24$ $p = 0,0316$ $n = 83$				
Glicose		$r = 0,22$ $p = 0,0377$ $n = 88$					$r = -0,28$ $p = 0,0091$ $n = 85$			
IL-6 sérica									$r = 0,31$ $p = 0,0326$ $n = 47$	
TNF α sérico									$r = 0,32$ $p = 0,0306$ $n = 47$	
SAA sérica	$r = 0,21$ $p = 0,0569$ $n = 86$				$r = 0,25$ $p = 0,0194$ $n = 84$					

^a r = coeficiente de correlação de Spearman. ^bO “n viável” foi dependente da disponibilidade de amostras teciduais e limitado para correlações com algumas variáveis, tais como: tempo de menopausa (n=41 a 43), IL-6 sérica e TNF- α sérica (n= 47); TU: tecido tumoral e NT: tecido não tumoral. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$)

Não foi encontrada correlação entre os percentuais de expressão do marcador de proliferação Ki-67 no TU com as variáveis numéricas do estudo. Entretanto, quando foram considerados os *cutoffs* de Ki-67 e de HDL (≥ 50 mg/dl, valor de referência (VR) para mulheres, (107)), detectou-se relação inversa entre a expressão de Ki-67 e os níveis plasmáticos de HDL-Col (Figura 5).

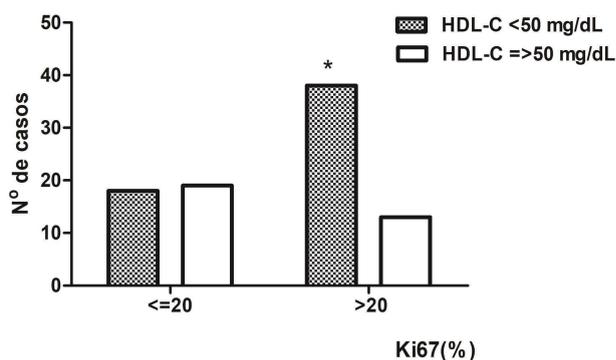


Figura 5: Relação inversa entre frequências de expressão mais elevadas do marcador de proliferação Ki-67 (Ki-67 >20) com os níveis plasmáticos de HDL-Col abaixo do VR para mulheres (VR: HDL-Colesterol ≥ 50 mg/dL). Análise realizada pelo teste exato de Fisher, * $p=0,0151$. Nível de significância adotado: 5% ($p < 0,05$).

4.5. Avaliação da Correlação das Frequências dos Marcadores de CTNs, de Proliferação e de Inflamação com as concentrações séricas de IL-6, TNF- α e SAA

A avaliação das correlações dos escores de expressão dos marcadores de CTNs (ALDH1, CD44 e Oct4), de proliferação (Ki-67) e de inflamação (IL-6, TNF- α e SAA), tanto no tecido tumoral quanto no não tumoral, com as concentrações séricas de parâmetros inflamatórios (IL-6, TNF- α e SAA) detectou correlação positiva entre os escores de expressão de IL-6 no tecido tumoral (IL-6 TU) e as concentrações séricas de SAA, $r=0,25$, $p=0,0194$, bem como entre os escores de expressão de CD44 no tecido epitelial não tumoral (NT) e as concentrações séricas das citocinas inflamatórias IL-6 ($r=0,31$, $p=0,0326$) e TNF- α ($r=0,32$, $p=0,0306$), conforme demonstrado na Tabela 6.

Além disso, verificou-se tendência de correlação entre os escores de expressão de ALDH1 no tecido epitelial tumoral (TU) e as concentrações séricas de SAA, $r = 0,21$, $p = 0,0569$. Esse achado foi corroborado pela detecção de frequência mais elevada de expressão de ALDH1EpTU no grupo de participantes com o tercil mais elevado de SAA sérica, $p = 0,00131$, Figura 6-A.

Quando o mesmo tipo de análise foi realizado para outros marcadores teciduais, verificou-se frequência mais elevada de expressão de IL-6 tumoral (TU) nos grupos de participantes com tercis mais elevados de SAA sérica, respectivamente, tercil 2 vs tercil 1, $p = 0,0141$ e tercil 3 vs tercil 1, $p = 0,0084$, Figura 6-B.

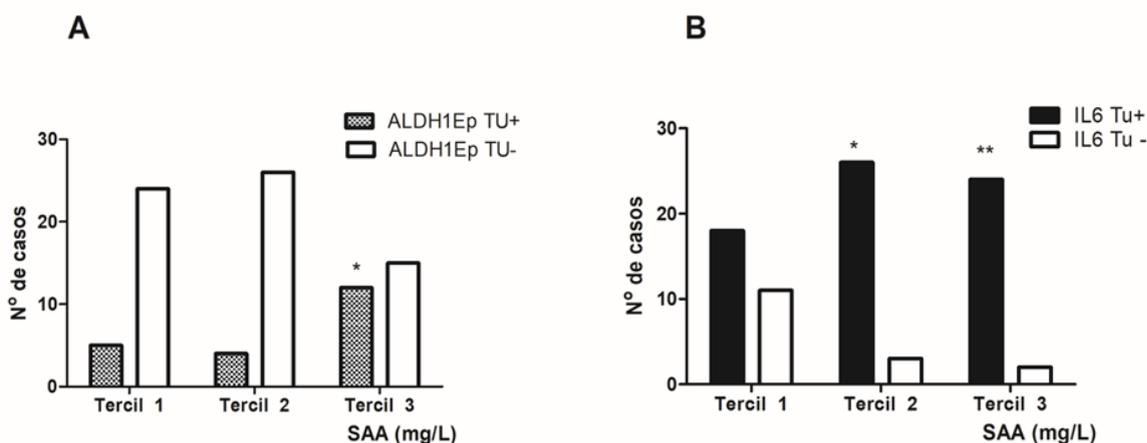


Figura 6: Comparação das frequências de expressão de marcadores teciduais entre tercis de concentrações séricas de SAA. **A.** Associação positiva entre a expressão de ALDH1 no epitélio tumoral (ALDH1Ep TU+) e o tercil 3, com concentrações mais elevadas de SAA. *tercil 3 vs tercil 1 e tercil 2, $p = 0,00131$. **B.** Associação positiva entre a expressão de IL-6 no epitélio tumoral (IL-6 TU+) e os tercis 2 e 3, com concentrações mais elevadas de SAA. * tercil 2 vs tercil 1, $p = 0,0141$ e **tercil 3 vs tercil 1, $p = 0,0084$. Análises realizadas pelo teste Qui-quadrado ou exato de Fisher. Nível de significância adotado: 5% ($p < 0,05$).

4.6. Associação das Frequências dos Marcadores de Células Tronco Neoplásicas (CTNs), de Proliferação e de Inflamação com as Características Clinicopatológicas da Doença, nos diferentes TMAs

A Tabela 7 resume os resultados das análises de associação da expressão dos marcadores de CTNs (ALDH1, CD44 e Oct4), de proliferação (Ki-67) e de inflamação (IL-6, TNF- α e SAA), tanto no tecido tumoral (TU) quanto no não tumoral (NT), com as características clinicopatológicas da doença.

Em relação ao estadiamento clinicopatológico (Ec_p), quando a análise estatística considerou os três estadios de forma independente (I, II ou III), foi detectada associação estatisticamente significativa com o marcador de CTNs ALDH1 no tecido epitelial (Ep) das amostras de TU, com maior frequência de expressão nas amostras de participantes com Ec_p II (59,1%) e Ec_p III (36,4%), em relação àquelas com Ec_p I (4,5%), $p = 0,036$.

Para os componentes individuais do sistema TNM (T: extensão do tumor primário; N: ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais (N); M: ausência ou presença de metástase à distância), verificou-se associação apenas entre a expressão tecidual de IL-6 e acometimento em N, $p = 0,029$.

A avaliação da associação de expressão dos diferentes marcadores teciduais com o grau nuclear, demonstrou resultado estatisticamente significativo somente com a expressão do CD44 no epitélio das amostras de tecido tumoral categorizadas com grau 3, correspondendo a 75% das amostras, $p = 0,035$.

Com relação ao grau histológico (GH), foi observada associação significativa da expressão de IL-6 TU com GH mais avançado, ou seja, em 72,5% dos microarranjos TU, provenientes de tumores classificados com GH 3 ($p = 0,035$). Ainda em relação ao GH, foi detectada associação com o marcador de CTN, Oct4, no tecido NT de tumores mais avançados, GH 2 (27,8%) e GH3 (61,1%), $p = 0,040$.

Não foram verificadas associações entre as expressões dos diferentes marcadores teciduais, quer no tecido TU ou NT, com o *status* dos receptores hormonais, ou com HER2, ou ainda, com os subtipos moleculares

Tabela 7 – Associação entre a expressão de marcadores teciduais e as características clinicopatológicas da doença

Marcadores	N n (%) ^a				Ec _p n (%)				GN n (%)				GH n (%)				
	1	2	3	p	I	II	III	p	1	2	3	p	1	2	3	p	
TU^b																	
ALDH1 Epitélio																	
Positivo (n= 22)					1 (4,5)	13 (59,1)	8 (36,4)										
Negativo (n= 66)					21 (31,8)	26 (39,4)	19 (28,8)	0,036									
CD44 Epitélio																	
Positivo (n= 64)									0 (0,0)	16 (25,0)	48 (75,0)						
Negativo (n= 20)									0 (0,0)	10 (50,0)	10 (50,0)	0,035					
IL6																	
Positivo (n= 69)	35 (50,7)	14 (20,3)	20 (29,0)										1 (1,5)	18 (26,1)	50 (72,5)		
Negativo (n= 17)	6 (35,3)	9 (52,9)	2 (11,8)	0,029									3 (17,7)	4 (23,5)	10 (58,8)	0,035	
NT																	
Oct4																	
Positivo (n= 36)													4 (11,1)	10 (27,8)	22 (61,1)		
Negativo (n= 46)													0 (0,0)	10 (21,7)	36 (78,3)	0,040	

^aDados expressos como frequência absoluta (n) e relativa (%) de positividade ou negatividade, de acordo com a classificação dicotômica, descrita na tabela 2. ^bMicroarranjos teciduais (TMAs) realizados para diferentes regiões do espécime cirúrgico: tecido tumoral: TU, tecido não tumoral: NT. Análises realizadas pelo teste χ^2 ou exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.7. Avaliação da influência dos marcadores teciduais e séricos na sobrevida livre de doença

A análise de regressão de Cox univariada, para estudar os fatores relacionados com a sobrevida livre de doença (SLD), apresentou como resultados estatisticamente significativos as seguintes variáveis: peso, a ausência da expressão do marcador de CTN ALDH1 no estroma do tecido tumoral (ALDH1EsTU), as expressões teciduais de IL-6 TU e de Ki-67 TU, a expressão de SAA no tecido não tumoral (SAA NT), os valores de SAA sérica, a ausência da expressão dos receptores hormonais RE e RP e o subtipo molecular triplo negativo (TN), conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 – Influência dos diferentes fatores sobre a SLD pela regressão de Cox univariada

Variável	Categorias	<i>p</i>	H.R. *	IC 95% H.R.*
Peso (tercis)	≤61 (ref.)	—	1,00	—
	62-75	0,131	2,74	0,74 – 10,12
	≥76	0,042	3,76	1,05 – 13,50
ALDH1 Estromal TU	Positivo (ref.)	—	1,00	—
	Neg/muito fraco	0,048	2,60	1,01-6,72
Ki-67 TU (tercis)	≤11 (ref.)	—	1,00	—
	12-45	0,024	0,17	0,04 – 0,79
	≥46	0,916	1,05	0,42 – 2,61
IL-6 TU	variável contínua	0,009	2,53	1,26-5,08
SAA NT	variável contínua	0,034	4,51	1,13-18,06
SAA sérica (tercis)	≤2.35 (ref.)	---	1,00	---
	2,36-5,45	0,086	3,14	0,85 – 11,62
	≥5,46	0,023	4,40	1,23 – 15,78
RE	Positivo (ref.)	—	1,00	—
	Negativo	0,005	3,22	1,42-7,31
RP	Positivo (ref.)	—	1,00	—
	Negativo	0,009	3,04	1,32-7,04
Subtipo Molecular	Luminal (ref.)	—	1,00	—
	Luminal HER	0,895	1,09	0,30-4,05
	HER	0,150	2,24	0,75-6,72
	Triplo Negativo	<0,001	6,72	2,34-19,29
Subtipo Molecular Agrupado	Luminal (ref.)	—	1,00	—
	Lum. HER/ HER	0,332	1,61	0,62-4,19
	Triplo Negativo	<0,001	6,72	2,34-19,28

* HR (Hazard Ratio) = Razão de risco para recidiva, n=90 e recidivas=23. Ref.: nível de referência. TU = tecido tumoral, NT = tecido não tumoral, RE = receptor de estrogênio, RP = receptor de progesterona, IC = intervalo de confiança, ref. = referência

Em seguida, procedeu-se a análise de regressão de Cox múltipla para selecionar os fatores independentes relacionados com a SLD, que detectou os seguintes fatores: a ausência da expressão do marcador de CTN ALDH1 no estroma do tecido tumoral (ALDH1Es-TU), a expressão de IL-6 no TU e a influência do subtipo molecular triplo negativo (TN).

Posteriormente, quando a análise foi repetida na presença das variáveis de controle: grupos (não obesas (NO) e sobrepeso/obesidade (SP/O)), idade e tercis de SAA sérica, verificou-se que os mesmos fatores, ou seja, ausência de ALDH1Es-TU, escores mais elevados de IL6TU e o subtipo molecular TN, continuaram a influenciar significativamente a SLD, conforme demonstrado na Tabela 9. A análise final demonstrou que: a ausência de ALDH1 no estroma tumoral (ALDH1Es-TU) apresenta risco de recidiva 13,2 vezes maior; a expressão de IL-6 no tecido tumoral aumenta o risco de recidiva em 7,6 vezes a cada unidade (escore) e o subtipo molecular TN aumenta o risco em 14,2 vezes.

Tabela 9 – Influência dos marcadores teciduais tumorais e subtipos moleculares sobre a SLD pela regressão de Cox múltipla após ajuste pelas variáveis de controle

Variável	Categorias	p	H.R. *	IC 95% H.R.*
ALDH1 Estromal TU	Positivo (ref.)	---	1,00	---
	Neg/muito fraco	<0,001	13,24	2,90 – 60,39
IL-6 TU	variável contínua	0,003	7,57	2,04 – 28,04
Subtipo Molecular Agrupado	Luminal (ref.)	---	1,00	---
	Lum. HER/ HER	0,160	2,73	0,67 – 11,07
	Triplo Negativo	0,009	14,23	1,95 – 103,71

* HR (Hazard Ratio) = Razão de risco para recidiva; n=60 e recidivas=16. Ref.: nível de referência. TU = tecido tumoral. Variáveis de controle: grupos NO e SP/O, idade e tercis de SAA. Lum. HER = luminal HER. IC = intervalo de confiança, ref. = referência

As Figuras 7, 8 e 9 apresentam as curvas de SLD frente aos fatores selecionados na análise de regressão de Cox múltipla, respectivamente, ALDH1EsTU, IL-6 TU e tumores TN.

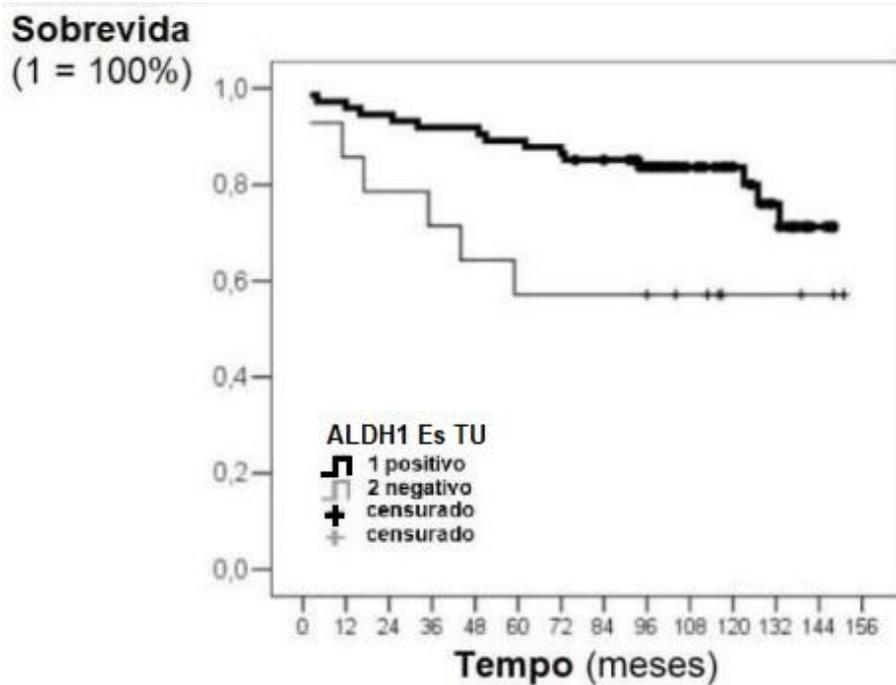


Figura 7: Influência da ALDH1EsTU sobre a SLD. Teste de Log-Rank, $p=0,040$. 1: positivo, $n=74$, recidiva=15; 2: negativo, $n=14$, recidivas=6

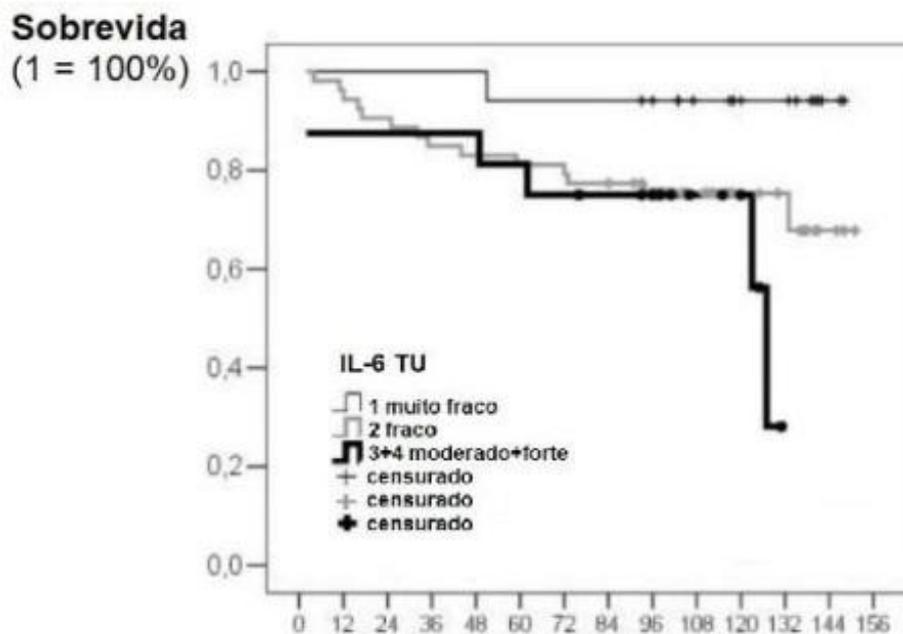


Figura 8: Influência da IL-6 TU sobre a SLD. Teste de Log-Rank, $p=0,064$, seguido por Mantel-Cox, 1 vs 2, $p=0,068$, 1 vs 3+4: $p=0,013$, 2 vs 3+4, $p=0,325$. 1: muito fraco, $n=17$, recidiva=1; 2: fraco, $n=53$, recidivas=14, e 3+4: moderado+forte, $n=16$, recidivas=6

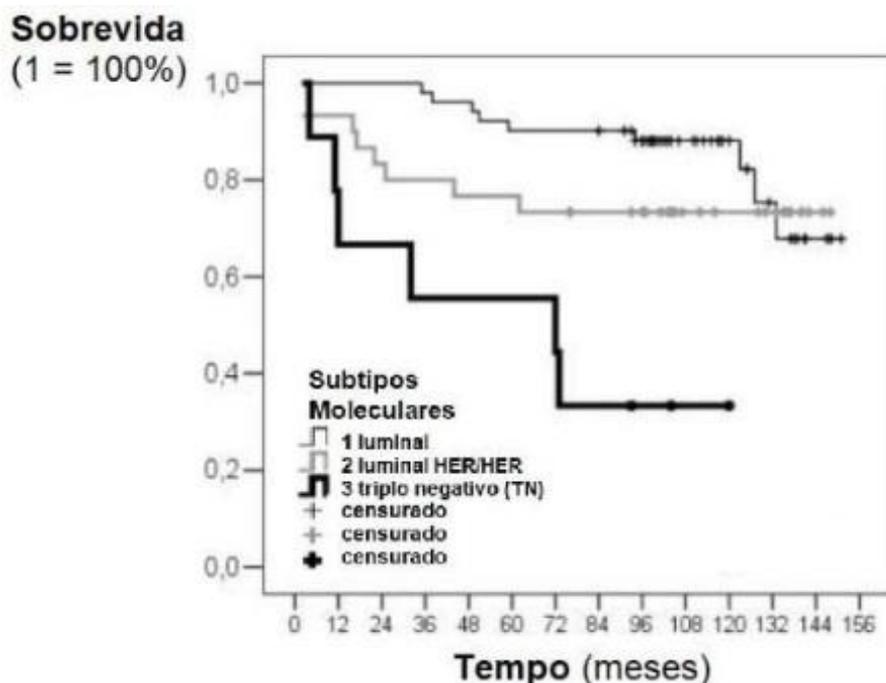


Figura 9: Influência dos subtipos moleculares sobre a SLD. Teste de Log-Rank, $p < 0,001$, seguido por Mantel-Cox, 1 vs 2, $p = 0,328$, 1 vs 3: $p < 0,001$, 2 vs 3, $p = 0,029$. 1: luminal, $n = 51$, recidivas=9; 2: luminal HER/HER, $n = 30$, recidivas=8 e 3: TN, $n = 9$, recidivas=6

4.8. Avaliação da influência dos marcadores teciduais e séricos na sobrevivência global das pacientes

A análise de regressão de Cox univariada para estudar os fatores relacionados com a sobrevivência global (SG) apresentou como resultado estatisticamente significativo os seguintes fatores: peso, as expressões de Ki-67 e de IL-6 no TU, a presença de SAA no tecido não tumoral (NT), os valores de SAA sérica, o grau nuclear, o tamanho do tumor, a ausência dos receptores de estrogênio e progesterona e os subtipos moleculares HER, luminal HER + HER (agrupados) e triplo negativo (TN), conforme demonstrado na Tabela 10.

Também foi realizada a análise de sobrevivência global univariada para as seguintes variáveis: obesidade, com grupo de não obesas (NO) como referência, avaliando-se o grupo sobrepeso/obesidade (SP/O); estado menopausal, com o grupo das mulheres na pré-menopausa como referência; o tempo de menopausa na forma de variável contínua e na apresentação em tercis (grupo 0 meses como referência, grupo até 12 meses e grupo com 13 meses ou mais); etnia, com as caucasianas como referência, comparando-se com as mulheres pardas, idade e IMC. Não foram observados resultados estatisticamente significativos para nenhum desses fatores.

Tabela 10 – Influência dos diferentes fatores sobre a SG pela regressão de Cox univariada

Variável	Categorias	<i>p</i>	H.R. *	IC 95% H.R.*
Peso (tercis)	≤61 (ref.)	—	1,00	—
	62-75	0,235	2,64	0,53 – 13,08
	≥76	0,038	5,00	1,09 – 22,84
Ki-67 TU (tercis)	≤11 (ref.)	—	1,00	—
	12-45	0,031	0,10	0,01 – 0,81
	≥46	0,513	0,71	0,25 – 1,99
IL-6 TU	Positivo (ref.)	—	1,00	—
	Neg/muito fraco	0,029	0,12	0,01-0,99
IL-6 TU	variável contínua	0,024	2,41	1,121-5,17
SAA NT	variável contínua	0,032	4,82	1,147-20,29
SAA sérica (tercis)	≤2,35 (ref.)	—	1,00	—
	2,36-5,45	0,247	2,64	0,51 – 13,59
	≥5,46	0,013	6,71	1,48 – 30,33
GN	2 (ref.)	—	1,00	—
	3	0,039	8,40	1,12-63,11
Tamanho do Tumor	1 (ref.)	—	1,00	—
	2	0,037	3,76	1,08-13,09
	3	0,528	0,94	0,06-15,66
	4	0,831	1,28	0,13-12,31
RE	Positivo (ref.)	—	1,00	—
	Negativo	<0,0001	5,47	2,11-14,15
RP	Positivo (ref.)	—	1,00	—
	Negativo	0,002	4,95	1,76-13,90
Subtipo Molecular	Luminal (ref.)	—	1,00	—
	Luminal HER	0,228	2,51	0,56-11,23
	HER	0,014	5,18	1,39-19,31
	Triplo Negativo	<0,001	12,91	3,62-46,10
Subtipo Molecular Agrupado	Luminal (ref.)	—	1,00	—
	Lum. HER/ HER	0,033	3,71	1,12-12,31
	Triplo Negativo	<0,001	12,90	3,61-46,05

* HR (*Hazard Ratio*) = Razão de risco para óbito, n=90 e óbitos=18. Ref.: nível de referência. TU = tecido tumoral, NT = tecido não tumoral, GN = grau nuclear, RE = receptor de estrogênio, RP = receptor de progesterona. IC = intervalo de confiança, ref. = referência

A análise de regressão de Cox múltipla selecionou os seguintes fatores independentes, relacionados com a SG: a expressão de IL-6 no TU e os subtipos moleculares luminal HER + HER (agrupados) e TN. Quando a análise foi repetida na presença das variáveis de controle (grupos NO e SP/O, idade e tercis de SAA sérica), observou-se a manutenção dos resultados, que demonstraram que a expressão de IL-6 no tecido tumoral aumenta o risco de óbito em 4,3 vezes a cada unidade (escore) e os subtipos moleculares luminal HER/HER agrupados e TN aumentam o risco de óbito em 9,2 e 14,9 vezes respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 – Influência da IL-6 TU e dos subtipos moleculares sobre a SG pela regressão de Cox múltipla após ajuste pelas variáveis de controle

Variável	Categorias	<i>p</i>	H.R. *	IC 95% H.R.*
IL-6 TU	variável contínua	0,045	4,34	1,04 – 18,20
Subtipo Molecular Agrupado	Luminal (ref.)	—	1,00	—
	Lum. HER/ HER	0,012	9,19	1,63 – 51,92
	Triplo Negativo	0,016	14,92	1,67 – 133,46

* HR (*Hazard Ratio*) = Razão de risco para óbito, n=60 e óbitos=12. Ref.: nível de referência. TU = tecido tumoral. Variáveis de controle: subgrupos NO e SP/O, idade e tercis de SAA. IC = intervalo de confiança, ref. = referência

As Figuras 10 e 11 apresentam as curvas de SG frente aos fatores selecionados na análise de regressão de Cox múltipla, respectivamente IL-6 TU e subtipos moleculares luminal HER/HER e TN.

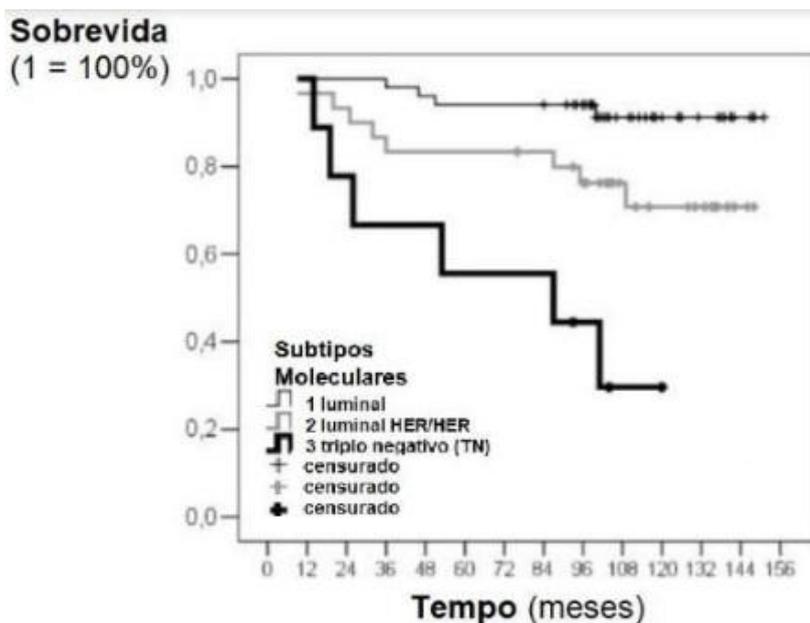


Figura 10: Influência dos subtipos moleculares sobre a SG. Teste de Log-Rank, $p < 0,001$, seguido por Mantel-Cox, 1 vs 2, $p = 0,020$, 1 vs 3: $p < 0,001$, 2 vs 3, $p = 0,014$. 1: luminal, $n = 51$, óbitos=4; 2: luminal HER/HER, $n = 30$, óbitos=8 e 3: TN, $n = 9$, óbitos=6

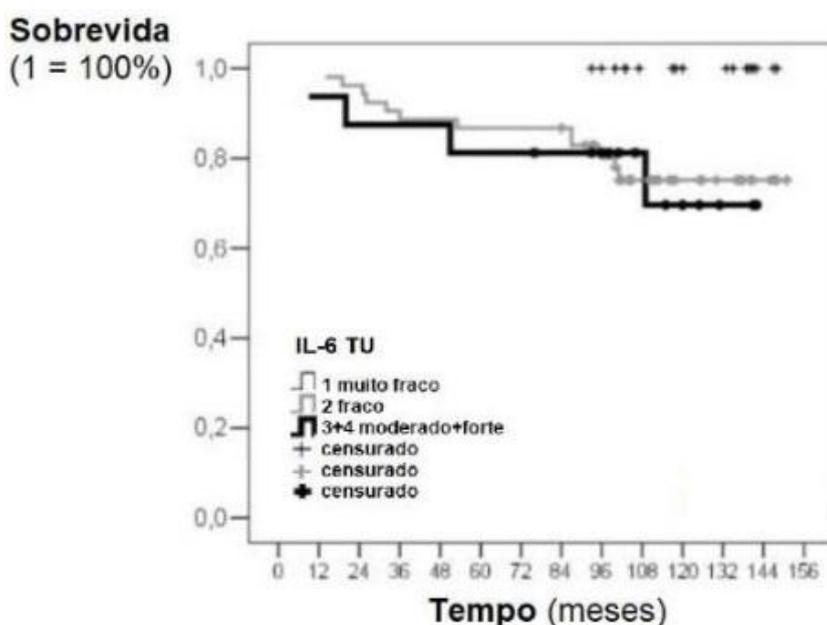


Figura 11: Influência da IL-6 TU na SG. Teste de Log-Rank, $p = 0,090$, seguido por Mantel-Cox, 1 vs 2, $p = 0,032$, 1 vs 3: $p = 0,026$, 2 vs 3+4, $p = 0,818$. 1: muito fraco $n = 51$, óbitos=4; 2: fraco, $n = 30$, óbitos=8 e 3: moderado+forte, $n = 9$, óbitos=6

Em seguida, julgamos pertinente o levantamento das principais características das participantes da pesquisa que apresentaram recidivas ou foram a óbito e que apresentaram ausência de expressão de ALDH1Es-TU (Tabela 12) ou escores mais elevados de expressão de IL-6⁺ TU (Tabela 13).

Tabela 12 – Características das participantes com eventos relacionados à ausência de expressão de ALDH1 nos estromas dos microarranjos tumorais (ALDH1Es⁻TU)

ID	Evento	SLD meses	SG meses	Subtipo Molecular	Tratamento Adjuvante	Grupo	Idade	Estado Menop.	SAA* mg/L	HDL mg/dL	Ki-67 %
215	Recidiva	59	126	Luminal	QT+RT+HT	NO	39	Pré	0,97	35	71
101	Óbito	35	36	Luminal	QT+RT+HT	SP/O	40	Pré	1,68	40	1
81	Óbito	2	20	HER	QT	NO	47	Pós	4,30	63	95
119	Óbito	44	95	HER	QT+RT+IT	SP/O	49	Pré	6,88	42	70
160	Óbito	17	25	HER	QT+RT+IT	SP/O	31	Pré	2,51	31	1
192	Óbito	11	26	TN	QT+RT	SP/O	45	Pós	13,10	42	5

*Tercis de SAA: 1) < 2,42 mg/L; 2) 2,42-5,44 mg/L; 3) 5,49-36,2 mg/L. HT: hormonioterapia, IT: imunoterapia, QT: quimioterapia, RT: radioterapia. NO: não obesa, SP/O: sobrepeso/obesidade. Estado menop. = estado menopausal

As análises de SLD demonstraram a influência da ausência de expressão de ALDH1Es nos microarranjos TU, com incidência de 42,9 % de eventos nos casos negativos (ALDH1Es⁻TU) em comparação ao percentual de 20,3% nos positivos.

Entre os tumores com ausência de expressão de ALDH1 nos estromas dos microarranjos tumorais (ALDH1Es⁻TU), houve maior incidência do subtipo molecular HER (50%), seguido de 33,3% de luminal e 16,7% de TN.

Embora não tenha havido influência da ALDH1Es⁻TU na SG, podemos observar uma rápida evolução para óbito, na maioria dos casos.

Tabela 13 – Características das participantes com eventos relacionados à expressão de IL-6, com escore ≥ 3 , nos microarranjos tumorais (IL-6TU).

ID	Evento	SLD meses	SG meses	Subtipo Molecular	Tratamento Adjuvante	Grupo	Idade	Estado Menop.	SAA* mg/L	HDL mg/dL	Ki-67 %
97	Recidiva	123	142	Luminal	QT+RT+HT	SP/O	40	Pré	2,43	37	0
113	Recidiva	127	141	Luminal	QT+HT	SP/O	36	Pré	3,75	33	70
199	Óbito	49	51	Luminal	QT+RT+HT	SP/O	55	Pós	2,62	44	90
33	Óbito	2	9	Luminal HER	QT+RT	SP/O	64	Pós	7,06	31	67
49	Óbito	62	109	HER	QT+RT+IT	SP/O	45	Pré	3,70	54	11
81	Óbito	2	20	HER	QT	NO	47	Pós	4,30	63	95

*Tercis de SAA: 1) < 2,42 mg/L; 2) 2,42-5,44 mg/L; 3) 5,49-36,2 mg/L. HT: hormonioterapia, IT: imunoterapia, QT: quimioterapia, RT: radioterapia. NO: não obesa, SP/O: sobrepeso/obesidade. Estado menop. = estado menopausal

As análises de SLD e SG demonstraram a influência dos escores de positividade da expressão de IL-6 nos microarranjos TU sobre as recidivas e óbitos. Foi possível observar que, entre os microarranjos IL-6⁺TU relacionados a eventos, 37,5% apresentaram escores ≥ 3 e 26,4%, escore 2.

Entre os tumores que apresentaram escore ≥ 3 houve predominância do subtipo molecular luminal (50%), seguido de 33,3% de HER e 16,7% de luminal HER. Considerando somente os casos relacionados aos óbitos, a frequência foi de 50% para HER, 25% para luminal e 25% para luminal HER, enquanto que para aqueles relacionados somente às recidivas, houve predominância de luminal (100%).

Também é importante ressaltar que a totalidade das participantes cujos microarranjos mostraram escore ≥ 3 apresentaram concentrações séricas de SAA nos tercis superiores, acima de 2,42 mg/L e HDL abaixo do valor de referência para mulheres, ≥ 50 mg/dL (103).

5. DISCUSSÃO

Como resultado inicial da presente investigação, destaca-se a expressão diferencial da maioria dos marcadores teciduais entre os microarranjos tumorais (TU) e não tumorais (NT), com exceção do marcador de CTN: CD44 e dos marcadores de inflamação: IL-6 e TNF- α .

As frequências de expressão de ALDH1 e Ki-67 foram mais elevadas nos microarranjos TU, ao contrário de Oct4 e SAA, que mostraram maior expressão nos microarranjos NT. Provavelmente os microarranjos TU possuíam presença aumentada de CTNs expressando ALDH1, bem como um maior número de células em divisão, Ki-67⁺.

Em nosso trabalho, a expressão de ALDH1 foi detectada tanto nas células epiteliais (ALDH1Ep⁺) como nas células do estroma (ALDH1Es⁺), respectivamente em 25% e 84,1% dos TMAs tumorais. Ginestier et al. (88), ao examinarem dois grupos de tumores mamários: um com 136 casos e outro com 345, observaram a expressão de ALDH1 em 19% e 30% dos casos, respectivamente, semelhante à frequência que observamos nas células epiteliais tumorais (ALDH1Ep⁺TU). Os autores, entretanto, não reportaram detecção do marcador no estroma ou em região NT das amostras.

Já Bednarz-Knoll et al. (108) detectaram expressão de ALDH1 no estroma de TMAs de tumores mamários, porém em menor frequência, 52,7%, em comparação com nossos resultados (ALDH1Es⁺TU = 84,1%).

Embora não tenha havido expressão diferencial de CD44 entre os TMAs TU e NT, as frequências observadas em nosso trabalho foram maiores do que as reportadas na literatura, possivelmente devido às diferenças metodológicas e/ou de casuística (109).

A atual pesquisa observou expressão de Oct4 majoritária em amostras NT, com 43,9% de positividade das amostras, que poderia ser decorrente do processo celular de transformação para CTNs, conforme sugerido por Kim et al.

(110), que, em trabalho com indução de formação de mamófera (uma das propriedades das CTNs), observaram que parte das células não tumorais, ao adquirirem o perfil de CTNs, passaram a expressar o fator de transcrição Oct4. O resultado de nosso trabalho poderia sugerir que o microambiente da região NT poderia representar uma fase precursora da transformação celular tumoral, na qual a presença de Oct4 seria um marcador precoce.

No presente estudo, a frequência de expressão do marcador de proliferação Ki-67, com utilização de *cutoff* >20%, ocorreu em 56,8% das amostras TU. Este resultado está bastante próximo ao relatado por Shandiz et al. (111), que observaram positividade em 62,3% dos tumores de 106 mulheres, utilizando *cutoff* praticamente igual ao nosso ($\geq 20\%$) Já Bahaddin (112) observou expressão em 67,6% dos tumores de 278 mulheres, mas utilizou *cutoff* $\geq 14\%$, inferior ao nosso.

Os relatos na literatura sobre a expressão de SAA tecidual no câncer mamário são escassos. O presente estudo detectou 44,7% de positividade, semelhante ao grupo de Yang (45), que encontrou expressão de SAA em 44,2% dos casos, e próximo ao valor do grupo de Wang (113), que relatou positividade em 47,9% das análises.

Nosso próximo objetivo, representado pela comparação da expressão dos diferentes marcadores entre os TMAs dos grupos de participantes não obesas (NO) e com sobrepeso/obesidade (SP/O), não detectou expressão diferencial de qualquer dos marcadores teciduais entre os grupos.

Entretanto, quando voltamos nossa atenção para os parâmetros do sangue circulante associados à obesidade, verificamos correlações com alguns marcadores teciduais, destacando-se as correlações das concentrações séricas de SAA com os escores de expressão de ALDH1 no epitélio tumoral (ALDH1Ep TU⁺) e de IL-6 TU⁺, assim como as correlações dos níveis de colesterol total (Col-T) e de LDL-colesterol (LDL-col) com os escores de expressão de TNF- α TU⁺. O conjunto desses resultados poderia sugerir a existência de uma possível interação entre elementos do sangue periférico associados à obesidade (SAA sérica, Col-T e LDL-col) e o microambiente tumoral inflamatório.

No contexto de interação entre microambiente inflamatório e CTNs, a detecção de associação positiva entre a expressão de ALDH1Ep TU⁺ com concentrações séricas mais elevadas de SAA (Figura 6A), corrobora o resultado de correlação e poderia sugerir a influência da inflamação subclínica decorrente da obesidade na formação e manutenção de CTNs. Embora sem precedentes na literatura quanto ao seu papel direto na gênese de CTNs, a SAA poderia atuar indiretamente via indução de IL-6 (45), que por sua vez tem sido associada à gênese e manutenção de CTNs em linhagens de células tumorais mamárias (114, 115).

Ainda em relação à potencial influência da SAA sérica no microambiente tumoral, a observação de associação positiva entre a expressão de IL-6 no epitélio tumoral (IL-6 TU⁺) com concentrações séricas mais elevadas de SAA (Figura 6B), fortalece o resultado de correlação e poderia sugerir sua participação na indução de IL-6 (45, 116).

As correlações entre níveis plasmáticos de Col-T e LDL-col com os escores de expressão de TNF- α TU⁺ observadas no presente estudo poderiam estar relacionadas com suas influências respectivas no desenvolvimento do câncer mamário. Se por um lado os lípides atuam na síntese de membrana, no metabolismo, e na proliferação celular, como descrito por Cedó et al. (117), por outro lado o TNF- α presente no microambiente tumoral pode estimular a gênese de CTNs (118), regular a síntese de IL-6 e a expressão da aromatase no tecido adiposo, conforme relatado por Khan et al. (119), fatores esses envolvidos com o desenvolvimento do câncer mamário e com a sua propagação.

Já, em sua função antagônica, a HDL-col possui a capacidade de manter a homeostase do colesterol pelo transporte reverso da LDL-col (117) e também ao retirar, da região tumoral, moléculas como LDL oxidado e metabólitos, como o 27-hidroxicoesterol, encaminhando-os para o fígado e impedindo sua utilização na proliferação celular, ao diminuir sua disponibilidade para ser utilizado como componente estrutural em membranas celulares e outras funções metabólicas. Além disso, a HDL também reduz o estresse oxidativo e as moléculas pró-inflamatórias do microambiente tumoral, inibe a angiogênese e participa no impedimento do escape do sistema imune pelas células tumorais (120).

No presente estudo foi observada relação inversa entre as frequências de expressão do marcador de proliferação Ki-67, acima do *cutoff*, e os níveis plasmáticos de HDL-Col, abaixo do valor de referência para mulheres (Figura 5). Tendo em vista as atuações da HDL, níveis reduzidos poderiam, inversamente, impedir o seu desempenho, incluindo a inibição da proliferação celular, o que seria uma possível explicação para o resultado encontrado em nosso trabalho.

Entre os fatores apontados por Pirro et al. (121) para explicar a diminuição da HDL, na presença de câncer, figuram a elevação de citocinas pró-inflamatórias que causam alterações no perfil lipídico, incluindo a diminuição nos níveis de HDL e o acúmulo de tecido adiposo, possivelmente associado à resistência à insulina. Já Centonze et al. (122) destacam que a atuação desregulada da mitocôndria no câncer de mama influencia o aumento da entrada de colesterol no tumor através da expressão aumentada das proteínas StAR (*steroidogenic acute regulatory protein* – proteína de regulação aguda da esteroidogênese) e StARD3 (*StAR related lipid transfer domain-3* – domínio-3 do transportador de lípidos relacionado à proteína StAR), o que resulta em aumento da proliferação celular, metástase e sobrevivência das células tumorais. Os autores também citam o estímulo da via do mevalonato, que, ao atuar no aumento da produção de colesterol, contribuiria para a proliferação celular. Além disso, ressaltam que as células tumorais podem acumular gotículas de lipídios em seu citoplasma para usar como fonte de energia, e que estudos *in vivo* demonstraram correlação do acúmulo de ésteres do colesterol citoplasmático com a expressão de Ki-67. Tais evidências reforçam a nossa hipótese de que níveis diminuídos de HDL-col proporcionariam maior disponibilidade de LDL para utilização na proliferação celular, justificando a associação inversa de baixos níveis de HDL com frequências mais elevadas de Ki-67.

Em concordância com os resultados obtidos na presente investigação, Sun et al. (123), em um estudo retrospectivo com 170 mulheres, encontraram associação inversa entre os níveis plasmáticos de HDL e a expressão do marcador de proliferação Ki-67.

Em relação às características clinicopatológicas da doença, o presente estudo observou que o marcador de CTNs ALDH1 no epitélio TU associou-se com estadios mais avançados de E_{c_p} , tendo sido semelhante aos obtidos por Yao et al. (96), que observaram correlações significativas entre esse marcador de CTNs e estadio mais avançado, assim como com tamanho do tumor e grau histológico mais elevados. Já Ginestier et al. (88) encontraram associação de ALDH1 com maior grau histológico, enquanto Rabinovich et al. (124), além de relatar associação com maior grau histológico, também observaram relação com tumores de maior extensão. Althobiti et al. (97), por sua vez, encontraram associação com tumores maiores e maior acometimento de linfonodos. O nosso resultado soma-se aos anteriores, para confirmar a ALDH1 como um fator prognóstico, provavelmente por identificar CTNs, que atuariam na geração e progressão do tumor.

Outro marcador de CTNs avaliado pelo presente estudo que apresentou associação com as características clinicopatológicas da doença foi o CD44, cuja expressão no epitélio TU foi associada com tumores de GN mais avançado, assim como relatado por Lee et al. (125) e Devrim e Balci (126) em carcinoma renal.

Nosso terceiro marcador de CTNs avaliado, o Oct4, mostrou-se presente em 43,9% dos microarranjos NT e teve sua expressão associada a tumores com graus histológicos (GH) mais avançados (27,8% GH2 e 61,1% GH3), tal qual foi observado por Liu et al. (127) e Gwak et al. (128) em tumores mamários, Zhou et al. (129), em tumores colorretais, e por Zhang et al. (130), em tumores de ovário.

Embora sem mencionar a associação de Oct4 com o GH, Abdelaziz et al. (131) verificaram, em tumores mamários, associação com subtipos moleculares mais agressivos, com a presença de metástase local e à distância, e com piores SLD e SG.

Posteriormente, ao explorarmos as associações dos marcadores de inflamação com as características clinicopatológicas da doença, observamos que a IL-6 no tecido TU associou-se com tumores de GH mais avançados. Embora a literatura recente não detalhe esse tipo de resultado, vários estudos citam a influência de IL-6 produzida pelas células tumorais na progressão do câncer

mamário, o que implicitamente a associa às características clinicopatológicas da doença (132-135).

Em seguida, para explorar as potenciais influências sobre a sobrevida livre de doença e sobrevida global das participantes, realizamos análises de regressão de Cox univariada e múltipla.

A regressão de Cox múltipla para sobrevida livre de doença, demonstrou que a ausência do marcador ALDH1 no estroma tumoral (ALDH1Es-TU), como um fator independente, apresenta risco de recidiva 13,2 vezes maior.

Similares aos nossos resultados, Lee e Kim (136) relataram influência da ausência de expressão de ALDH1 no estroma sobre a sobrevida global após 27,8 meses, sugerindo um possível efeito protetor de sua expressão no estroma, enquanto Bednarz-Knoll et al. (108) verificaram a influência benéfica da expressão estromal deste marcador sobre a SLD e maior ainda sobre a SG. A hipótese de ação protetora da ALDH1 no estroma seria decorrente de sua participação na produção de ácido retinóico, que por sua vez atuaria na diferenciação celular, na supressão da migração celular e da proliferação, com conseqüente diminuição da agressividade do tumor. Complementando a influência da atuação do ácido retinóico, Hua et al. (137), em estudos com cultura de células MCF-7, observaram que sua via de sinalização antagoniza a via de sinalização do estrogênio no câncer de mama, induzindo a diferenciação celular e inibindo a proliferação. Em contrapartida, a ligação entre o estrogênio e seu receptor é capaz de antagonizar a sinalização do ácido retinóico, provavelmente devido a agonistas em comum entre as duas vias.

Também oferecendo suporte à linha de interpretação da função protetora da ALDH1 estromal, Schwartz et al. (138) verificaram que a expressão de ALDH1 no estroma de lesões benignas da mama foi maior do que em lesões malignas.

No presente estudo, as participantes com eventos relacionados à ausência de expressão de ALDH1 nos estromas dos microarranjos tumorais (ALDH1Es-TU) eram em sua maioria pertencentes ao grupo sobrepeso/obesidade e, em conseqüência disso, provavelmente com características de inflamação subclínica, tendo sido observado nessas participantes a presença de SAA em níveis

plasmáticos mais elevados e/ou HDL inferior a 50 mg/dl (Tabela 12). Possivelmente essas mulheres deixaram de receber uma atuação protetora de células estromais produtoras de ALDH1 que, se presentes, poderiam ter atuado na produção de ácido retinóico (AR). O AR, por sua vez, teria a possibilidade de interagir com os receptores nucleares de ácido retinóico (*retinoic acid receptor* - RAR)- α , β , γ e com o receptor retinóide X (*retinoid X receptor* - RXR)- α , β , γ , que atuam no DNA como heterodímeros e induzem a expressão de genes relacionados com a diferenciação celular, apoptose e inibição do crescimento celular, conforme descrito por Ma e Allan (139) e pelo grupo de Tomita (140). Assim, seria pertinente a hipótese de que, na ausência do efeito benéfico da ALDH1Es, a maioria dessas participantes desenvolveu subtipos moleculares de pior prognóstico.

No seguimento de nossas análises, foi observado que a expressão de IL-6 no tecido tumoral (IL-6 TU), também como um fator independente, aumenta o risco de recidiva em 7,6 vezes a cada unidade (escore).

A IL-6 é produzida por diversas células do microambiente tumoral, incluindo células estromais, do sistema imune e do próprio tumor e níveis elevados de IL-6, tanto no soro quanto no microambiente tumoral, estimulam a hiperativação da sinalização de JAK/STAT3 e são frequentemente associados com pior progressão da doença. A IL-6 tem importante atuação na inflamação e estimula a proliferação, a sobrevivência e a invasividade das células tumorais. A hiperativação de STAT3 nas células tumorais induz a produção de IL-6 e gera um *loop* de *feedback* positivo (141).

A quantidade de receptores de estrógeno (RE) ou de progesterona (RP) presentes no tumor é influenciada pela IL-6 (142). Tanto a IL-6 quanto o TNF- α aceleram o crescimento de tumores RE⁺ ao estimularem o aumento de estrógeno sérico, intratumoral e no tecido adiposo (143), sendo esse mecanismo intensificado pela obesidade, onde ambos atuam na aromatização do esteróide androstenediona C19 em estrona no tecido adiposo.

Respaldando nossos resultados de associação da IL-6 TU com maior risco de recidiva, Yamashita et al. (144), em estudo com 75 pacientes com câncer de mama, verificaram que as concentrações tumorais de IL-6, detectadas em teste

imunoenzimático, eram significativamente maiores em pacientes com estadio IV, com metástase à distância e com tumores maiores.

Passando para a análise dos fatores que poderiam influenciar a sobrevida global de forma independente em nosso estudo, a análise de regressão de Cox múltipla demonstrou que a expressão de IL-6 TU aumenta o risco de óbito em 4,3 vezes a cada unidade (escore).

Uma das possíveis hipóteses para a influência da expressão da IL-6 TU na SG observada, poderia ser a resistência aos quimioterápicos, por influência dessa citocina, como proposto por Conze et al. (145), após estudo em cultura de células. Os autores relataram que a IL-6 tumoral, de produção autócrina, promoveu multirresistência a quimioterápicos.

Na presente investigação, as participantes com eventos relacionados à expressão de IL-6, com escore ≥ 3 , nos microarranjos tumorais (IL-6 TU) pertenciam, quase que em sua totalidade, ao grupo sobrepeso/obesidade, todas com concentrações séricas de SAA mais elevadas e a maioria com níveis de HDL inferiores a 50 mg/dl (Tabela 13), reforçando a hipótese da ação prejudicial da inflamação subclínica relacionada com a obesidade, no desenvolvimento, progressão e invasividade dos tumores mamários.

A IL-6 é capaz de influenciar a quantidade de receptores de estrógeno (RE) ou de progesterona (RP) presentes no tumor (141), e de acelerar o crescimento de tumores RE+ (142), sendo esse mecanismo intensificado pela obesidade. Tais propriedades da IL-6 parecem justificar o observado no presente trabalho, ou seja, participantes com eventos relacionados à expressão de IL-6, com escore ≥ 3 , desenvolveram, em sua maioria, tumores do subtipo luminal ou luminal/HER, ou seja, que expressavam RE e, ao mesmo tempo, eram mulheres pertencentes ao grupo sobrepeso/obesidade.

As principais limitações deste trabalho são representadas por aspectos metodológicos, entre eles a restrição na obtenção de cortes de TMA viáveis para a investigação de todos os marcadores teciduais, o caráter subjetivo na leitura das lâminas, o “n” heterogêneo entre as variáveis estudadas (principalmente de citocinas

séricas) e o reduzido tamanho do grupo de participantes não obesas (NO), dificultado pelo duplo critério de inclusão (IMC e CA).

Apesar das limitações, os resultados das análises de sobrevida foram bastante animadores. As influências respectivas da ausência de ALDH1Es TU sobre a SLD e da IL-6 TU sobre a SLD e a SG reforçam as observações experimentais reportadas na literatura, relativas às ações antagônicas destes componentes no microambiente tumoral mamário e estimulam novas frentes de investigação voltadas para a área terapêutica.

Além disso, o conjunto dos resultados de associação do presente trabalho sugere a inter-relação entre vários fatores analisados, instigando sua continuidade por meio de estudos experimentais que permitam a investigação de mecanismos de ação dos vários fatores sobre a gênese e/ou a progressão do câncer mamário.

6. CONCLUSÕES

1. Houve expressão diferencial da maioria dos marcadores teciduais entre os microarranjos tumorais (TU) e não tumorais (NT), com exceção do marcador de CTN: CD44 e dos inflamatórios: IL-6 e TNF- α .
 - As frequências de expressão de ALDH1 e Ki-67 foram mais elevadas nos microarranjos TU, ao contrário de Oct4 e SAA, que mostraram maior expressão nos NT.
2. Não foi detectada expressão diferencial dos marcadores teciduais entre os grupos de não obesas (NO) e sobrepeso/obesidade (SP/O), entretanto foram encontradas correlações da expressão de alguns marcadores com parâmetros relacionados à obesidade.
3. Os marcadores teciduais demonstraram correlações com parâmetros relacionados à obesidade: perfil lipídico, glicose e indicadores séricos de inflamação subclínica.
 - **Marcadores de CTNs**
 - ALDH1 no estroma TU (ALDH1Es⁺TU) apresentou correlação positiva com glicose plasmática.
 - ALDH1 no epitélio TU apresentou correlação positiva com SAA sérica, com frequência mais elevada de expressão de ALDH1Ep⁺TU nos microarranjos de participantes com tercis mais elevados de SAA sérica.
 - CD44 no epitélio NT (CD44Ep⁺NT) correlacionou-se positivamente com concentrações séricas de IL-6 e TNF- α .
 - **Marcador de proliferação**
 - Ki-67 no tecido TU demonstrou relação inversa com níveis plasmáticos de HDL-colesterol

- **Marcadores de inflamação**
 - SAA no tecido NT apresentou correlação positiva com a circunferência abdominal.
 - TNF- α no tecido TU correlacionou-se positivamente com níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-colesterol.
 - IL-6 no tecido TU correlacionou-se positivamente com SAA sérica, com frequência mais elevada de expressão de IL-6 TU nos microarranjos de participantes com tercis mais elevados de SAA sérica
4. Os marcadores de CTNs mostraram maior associação com as características clinicopatológicas da doença do que os marcadores inflamatórios, conforme segue:
- **Associações dos marcadores de CTNs:**
 - ALDH1 no epitélio TU (ALDH1Ep⁺TU) associou-se com estadios mais avançados de E_c_p.
 - CD44 no epitélio TU (CD44Ep⁺TU) associou-se com tumores de GN mais avançado.
 - Oct4 mostrou-se presente em 43,9% dos microarranjos NT e teve sua expressão associada a tumores com graus histológicos mais avançados (27,8% GH2 e 61,1% GH3).
 - **Associações dos marcadores de inflamação:**
 - IL-6 no tecido TU associou-se com menor acometimento de linfonodos, mas com tumores de GH mais avançado.
5. A análise de regressão de Cox múltipla para Sobrevida Livre de Doença demonstrou que:
- A ausência do marcador ALDH1 no estroma tumoral (ALDH1Es⁻TU) apresenta risco de recidiva 13,2 vezes maior.
 - A expressão de IL-6 no tecido tumoral aumenta o risco de recidiva em 7,6 vezes a cada unidade (escore).

6. A análise de regressão de Cox múltipla para Sobrevida Global demonstrou que:
- A expressão de IL-6 no tecido tumoral aumenta o risco de óbito em 4,3 vezes a cada unidade (escore).

7. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization [Internet]. Cancer. [atualizada em 03 de Fevereiro de 2022; citada em 08 de Março de 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. Tipos de Câncer – Câncer de Mama. Versão para população. Estatísticas [atualizada em 26 de Setembro de 2022; citada em 26 de Fevereiro de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. Causas e Prevenção – Estatística de Câncer. Causas e Prevenção [atualizada em 18 de Julho de 2022; citada em 26 de Fevereiro de 2023]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2017. 130 p.
5. Junior NLR, Silva GA. Late-Stage Diagnosis of Breast Cancer in Brazil: Analysis of Data from Hospital-Based Cancer Registries (2000-2012). *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2018; 40(3):127-136.
6. Peroni FMA, Lindelow M, Souza DO, Sjoblom M. Realizing the right to health in Brazil's Unified Health System through the lens of breast and cervical cancer. *Int J Equity Health.* 2019; 3,18(1):39.
7. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2019. 120 p.
8. Cserni, G. Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica.* 2020; 112(1):25-41.
9. Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. New and Important Changes in the TNM

Staging System for Breast Cancer. Am Soc Clin Oncol Edu Book. 2018; 23;38:457-67.

10. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(19):10869-74.
11. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, 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. Ann Oncol, 2013; 24(9):2206-23.
12. Thomssen C, Balic M, Harbeck N, Gnant M. St. Gallen/Vienna 2021: A Brief Summary of the Consensus Discussion on Customizing Therapies for Women with Early Breast Cancer. Breast Care (Basel). 2021;16(2):135-43.
13. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. J Natl Cancer Inst. 2021; 113(7): 808–19.
14. Andre F, Ismaila N, Allison KH, Barlow WE, Collyar DE, et al. Biomarkers for Adjuvant Endocrine and Chemotherapy in Early-Stage Breast Cancer: ASCO Guideline Update. J Clin Oncol. 2022 Apr 19;JCO2200069.
15. Zhu H, Dogan B. American Joint Committee on Cancer’s Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. Eur J Breast Health. 2021; 17(3): 234–8.
16. Bowers LW, Hall G, Hill C, Brenner AJ, Drive FC, Antonio S. Obesity-associated systemic interleukin-6 promotes pre-adipocyte aromatase expression via increased breast cancer cell prostaglandin E2 production. Breast Cancer Res Treat. 2015;149(1):49–57.
17. Mullooly M, Yang HP, Falk RT, Nyante SJ, et al. Relationship between crown-like structures and sex-steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer patients. Breast Cancer Res. 2017;19;19(1):8.

18. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(5):378–97.
19. Li Y, Wang JP, Santen RJ, Kim TH, Park H, Fan P, et al. Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology.* 2010;151(11):5146–56.
20. Boonyaratanakornkit V, Hamilton N, Márquez-Garbán DC, et al. Extranuclear signaling by sex steroid receptors and clinical implications in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;466:51.
21. Lønning PE. Estradiol measurement in translational studies of breast cancer. *Steroids.* 2015;99(Part A):26–31.
22. Gérard C, Brown KA. Obesity and breast cancer—Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;2017:1–16.
23. Kolb R and Zhang W. Obesity and Breast Cancer: A case of inflamed adipose tissue. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1686.
24. Hawsawi Y, El-Gendy R, Twelves C, Speirs V, Beattie J. Insulin-like growth factor - Oestradiol crosstalk and mammary gland tumourigenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2013;1836(2):345–53.
25. Bleach R, Sherlock M, O'Reilly MW, McIlroy M. Growth Hormone/Insulin Growth Factor Axis in Sex Steroid Associated Disorders and Related Cancers. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:630503.
26. Wajchenberg BL. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000 Feb;44(1):13-20.
27. Coelho M, Oliveira T and Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013 Apr 20;9(2): 191-200.
28. Deng T, Lyon C J, Bergin S, Caligiuri M A HWA. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2016;23(11):421–49.

29. Wu Q, Li B, Li J, Sun S, Yuan J, Sun S. Cancer-associated adipocytes as immunomodulators in cancer. *Biomark Res.* 2021 Jan 7;9(1):2.
30. Zhao Y, He X, Shi X, Huang C, Liu J, Zhou S, et al. Association between serum amyloid A and obesity: A meta-analysis and systematic review. *Inflamm Res.* 2010;59(5):323–34.
31. Saxena N, Sharma D. Multifaceted Leptin network: the molecular connection between obesity and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2013;18(0):309–20.
32. Bhatelia K, Singh K, Singh R. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. *Cell Signal.* 2014;26(11):2350–7.
33. Stender JD, Nwachukwu JC, Kastrati I, Kim Y, Strid T, Yakir M, et al. Structural and Molecular Mechanisms of Cytokine-Mediated Endocrine Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Mol Cell.* 2017;65(6):1122–1135.e5.
34. Reggiani F, Falvo P and Bertolini F. Cellular and Molecular Players in the Interplay between Adipose Tissue and Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 29;22(3):1359.
35. Yao M, Brummer G, Acevedo D, Cheng N. Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity. *Adv Cancer Res.* 2016;132:265–367.
36. Unver N and McAllister. IL-6 Family Cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Jun;41:10-17.
37. Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2011;1815(2):197–213.
38. Korobeinikova E, Ugenskiene R, Insodaite R, Rudzianskas V, Jaselske E, Poskiene L, et al. Association of angiogenesis and inflammation-related gene functional polymorphisms with early-stage breast cancer prognosis. *Oncol Lett.* 2020 Jun;19(6):3687-3700.

39. Ma Y, Ren Y, Dai Z-J, Wu C-J, Ji Y-H, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(3):421–6.
40. Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(3):657–64.
41. Shah N, Jin K, Cruz L-A, Park S, Sadik H, Cho S. HOXB13 mediates tamoxifen resistance and invasiveness in human breast cancer by suppressing ER α and inducing IL-6 expression. *Cancer Res*. 2013; 73(17):5449-58
42. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020 Feb;43(1):1-18.
43. Dong S, Wang Z, Shen K, Chen X. Metabolic Syndrome and Breast Cancer: Prevalence, Treatment Response, and Prognosis. *Front Oncol*. 2021 Mar 25;11:629666.
44. Sun L, Ye RD. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene*. 2016;583(1):48–57.
45. Koga T, Torigoshi T, Motokawa S, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, et al. Serum amyloid A-induced IL-6 production by rheumatoid synoviocytes. *FEBS Lett*. 2008;582(5):579–85.
46. Yang M, Liu F, Higuchi K, Sawashita J, Fu X, Zhang L, et al. Serum amyloid A expression in the breast cancer tissue is associated with poor prognosis. *Oncotarget*. 2016;7(24):35843–52.
47. Ignacio RMC, Gibbs CR, Kim S, Lee E-S, et al. Serum amyloid A predisposes inflammatory tumor microenvironment in triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2019 Jan 11;10(4): 511-526.
48. Santana AB, Gurgel MSC, De Oliveira Montanari JF, Bonini FM, De Barros-Mazon S. Serum amyloid A is associated with obesity and estrogen receptor-negative tumors in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer*

Epidemiol Biomarkers Prev. 2013;22(2):270–4

49. Hanna M, Dumas I, Orain M, Jacob S, Têtu B, Sanschagrin F, et al. Association between local inflammation and breast tissue age-related lobular involution among premenopausal and postmenopausal breast cancer patients. *PLoS One*. 2017;12(8):1–18.
50. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: An acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(1):9–26.
51. Lin H-Y, Tan G-Q, Liu Y, Lin S-Q. The prognostic value of serum amyloid A in solid tumors:a meta-analysis. *Cancer Cell*. 2019 Mar 20;19:62.
52. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal--Redux. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(1):1–11.
53. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal —A historical perspective with a focus on the fundamental roles of increased vascular permeability and clotting. *Semin Thromb Hemost*. 2019 Sep;45(6):576-592.
54. Roles of IL-1 in Cancer: From Tumor Progression toResistance to Targeted Therapies
55. Tawara K, Scott H, Emathinger J, et al. Co-Expression of VEGF and IL-6 Family Cytokines is Associated with Decreased Survival in HER2 Negative Breast Cancer Patients: Subtype-Specific IL-6 Family Cytokine-Mediated VEGF Secretion. *Transl Oncol*. 2019 Feb;12(2):245-255.
56. Ceci C, Atzori MG, Lacial PM, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 signaling and its inhibition in modulating tumor invasion: experimental evidence in different metastatic cancer models. *Int J Mol*. 2020 Feb 18;21(4):1388.
57. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2012;2(98):1–17.
58. Quail DF and Dannenberg AJ. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Mar;15(3):139-154.

59. Greten FR and Grivennikov. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*. 2019 Jul 16;51(1):27-41.
60. Mezawa Y and Orimo A. Phenotypic heterogeneity, stability and plasticity in tumor-promoting carcinoma-associated fibroblasts. *FEBS J*. 2021 Mar 31. doi: 10.1111/febs.15851.
61. Landskron G, Fuente M De, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *J Immunol Res*. 2014;2014:14918.
62. Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3804–9.
63. Kobayashi NCC, Noronha SMR de. Cancer stem cells: a new approach to tumor development. *Rev Assoc Med Brasi*. 2015;61(1):86–93.
64. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–11.
65. Bahr C, Correia NC, Trumpp A. Stem cells make leukemia grow again. *EMBO J*. 2017;36(18):2667–9.
66. Chen W, Qin Y and Liu S. Cytokines, breast cancer stem cells (BCSCs) and chemoresistance. *Clin Transl Med* 2018; Sep 3;7:27.
67. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469(7330):314–22.
68. Zhao J, Li J, Schlößer HA, Popp F, Popp MC, Alakus H, et al. Targeting Cancer Stem Cells and Their Niche: Current Therapeutic Implications and Challenges in Pancreatic Cancer. *Stem Cells Int*. 2017;(2017):6012810.
69. Sakabe T, Azumi J, Umekita Y, Torigushi K, Hatano E, Hirooka Y, et al. Expression of Cancer Stem Cell-associated DKK1 mRNA Serves as Prognostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017;37(9):4881–8.
70. Haston S, Manshaei S, Martinez-barbera JP. Stem / Progenitor Cells in Pituitary Organ Homeostasis and Tumorigenesis. *J Endocrinol*. 2017;Aug:p11:

JOE-17-0258.

71. Szarynska M, Olejniczak A, Wierzbicki P, Kobiela J, Laski D, Sledzinski Z, et al. FasR and FasL in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2017;51(3):975–86.
72. Sakabe T, Azumi J, Haruki T, Umekita Y, Nakamura H, Shiota G. CD117 expression is a predictive marker for poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2017;13(5):3703–8.
73. Huang B, Fu SJ, Fan WZ, Wang ZH, Chen Z Bin, Guo SJ, et al. PKC ϵ inhibits isolation and stemness of side population cells via the suppression of ABCB1 transporter and PI3K/Akt, MAPK/ERK signaling in renal cell carcinoma cell line 769P. *Cancer Lett*. 2016;376(1):148–54.
74. Podergajs N, Motaln H, Rajčević U, Verbovšek U, Koršič M, Obad N, et al. Transmembrane protein CD9 is glioblastoma biomarker, relevant for maintenance of glioblastoma stem cells. *Oncotarget*. 2015;7(1):593–609.
75. Talati PG, Gu L, Ellsworth EM, Gironde MA, Trerotola M, Hoang DT, et al. Jak2-Stat5a/b Signaling Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem-Like Cell Properties in Prostate Cancer. *Am J Pathol*. 2015;185(9):2505–22.
76. Shima H, Yamada A, Ishikawa T, Endo I. Are breast cancer stem cells the key to resolving clinical issues in breast cancer therapy? *Gland Surg*. 2017;6(1):82–8.
77. Rodrigues CFD, Serrano E, Patrício MI, Val MM, et al. Stroma-derived IL-6, G-CSF and Activin-A mediated dedifferentiation of lung carcinoma cells into cancer stem cells. *Sci Rep*. 2018 Aug 1;8(1):11573.
78. Haider M-T, Ridlmaier N, Smit D J, Taipalennmäki H. Interleukins as Mediators of the Tumor Cell—Bone Cell Crosstalk during the Initiation of Breast Cancer Bone Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 12;22(6):2898.
79. Salamanna F, Borsari V, Contartese D, Costa V, et al. What Is the Role of Interleukins in Breast Cancer Bone Metastases? A Systematic Review of Preclinical and Clinical Evidence. *Cancers (Basel)*. 2019 Dec 13;11(12):2018.
80. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in

cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol.* 2018 May 10;11(1):64.

81. Roosta Y, Sanaat Z, Nikanfar AR, Dolatkah R, Fakhrjou A. Predictive Value of CD44 for Prognosis in Patients with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020 Sep 1;21(9):2561-2567.

82. Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De M, Fuente L, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012; 44:573–7.

83. Owens TW, Naylor MJ. Breast cancer stem cells. *Front Physiol.* 2013;4(225):1–10.

84. Afzali M, Vatankhah M, Nasser Ostad S. Investigation of simvastatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in cancer stem cells of MCF-7. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):725–30.

85. Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai S, et al. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One.* 2009;4(12):e8377.

86. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(s1):59–72.

87. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem / Progenitor Cell Properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506–11.

88. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555–67.

89. Ginestier C, Wicha MS. Mammary stem cell number as a determinate of breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2007;9(4):109.

90. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869–74.

91. Gong Y, Wang J, Huo L, Wei W, Ueno NT, Woodward WA. Aldehyde dehydrogenase 1 expression in inflammatory breast cancer as measured by immunohistochemical staining. *Clin Breast Cancer*. 2014;14(3):e81–8.
92. Lin Y, Zhong Y, Guan H, Zhang X, Sun Q. CD44⁺/CD24⁻ phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31(1):59.
93. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R25.
94. Visvader JE, Linderman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):755-68.
95. Ma F, Li H, Li Y, Ding X, Wang H, Fan Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) expression is an independent prognostic factor in triple negative breast cancer (TNBC). *Medicine (Baltimore)*. 2017 Apr;96(14):e6561.
96. Yao J, Jin Q, Wuang X-D, Zhu H-J, Ni Q-C. Aldehyde dehydrogenase 1 expression is correlated with poor prognosis in breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jun;96(25):e7171.
97. Althobiti M, Ansari RE, Aleskandarany M, Joseph C, Toss MS, Green AR, et al. The prognostic significance of ALDH1A1 expression in early invasive breast cancer. *Histopathology*. 2020 Sep;77(3):437-448. doi: 10.1111/his.14129.
98. Liu C-g, Lu Y, Wang B-b, Zhang Y-j, Zhang R-s, Lu Y, et al. Clinical implications of stem cell gene Oct-4 expression in breast cancer. *Ann Surg*. 2011 Jun;253(6):1165-71.
99. Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, et al. The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13(1):50.
100. Kalantari E, Madjd Z. Tissue microarrays, a revolution in pathology research. *Basic Clin Cancer Res*. 2014; 6(1):2-10.

101. Makretsov N, Gilks CB, Coldman AJ, Hayes M, Huntsman D. Tissue microarray analysis of neuroendocrine differentiation and its prognostic significance in breast cancer. *Human Pathology*. 2003; 34(10):23-36.
102. Fadare O, Desouki MM, Gwin K, Hanley KZ, Jarboe EA, Liang SX et al. Frequent expression of napsin A in clear cell carcinoma of the endometrium: potential diagnostic utility. *Am J Surg Pathol*. 2014; 38(2):189-96.
103. Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Svein A, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Onco*. 2006; 24:268-73.
104. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, 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. *Ann Oncol*, 2013; 24(9):2206-23.
105. Collett, D. *Modelling Survival Data in Medical Research*. 2nd ed. London: Chapman & Hall; 1994.
106. SAS Institute Inc. The PHREG Procedure. [atualizada em 22 de Dezembro de 2020, citada em 21 de Janeiro de 2023]. Disponível em: [https://documentation.sas.com/doc/en/statcdc/14.2/statug/statug_phreg_toc .htm](https://documentation.sas.com/doc/en/statcdc/14.2/statug/statug_phreg_toc.htm).
107. Grundy SM , Cleeman JI , Daniels SR , et al. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005;112:2735–2752.
108. Bednarz-Knoll N, Nastaly P, Żaczek A, Stoupiec M, Riethdorf S, Wikman H. Stromal expression of ALDH1 in human breast carcinomas indicates reduced tumor progression. *Oncotarget*. 2015; 6(29):26789-803.
109. Han Z, Chen Z, Zheng R, Cheng Z, Gong X, Wang D. Clinicopathological significance of CD133 and CD44 expression in infiltrating ductal carcinoma and their relationship to angiogenesis. *World J Surg Oncol*. 2015 Feb 15;13:56

110. Kim S-Y, Kang JW, Song X, Kim BK, Yoo YD, Kwon YT, et al. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal*. 2013; 25(4):961-9.
111. Shandiz FH, Shabahang H, Afzaljavan F, Sharifi N, Tavasoli A, Afzalaghaee M, Roshanzamir E, Pasdar A. Ki67 Frequency in Breast Cancers without Axillary Lymph Node Involvement and its Relation with Disease-free Survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016; 17(3):1347-50.
112. Bahaddin MM. A comparative study between Ki67 positive versus Ki67 negative females with breast cancer: Cross sectional study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2020; 60:232-5.
113. Wang F, Ye H, Zhu Q, Qu G, Wang L, Zhao M. Serum amyloid A expression is associated with breast cancer survival. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016; 9(10):9853-66.
114. Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C, Yuan Y. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol*. 2012 Apr;40(4):1171-9. doi: 10.3892/ijo.2011.1275. Epub 2011 Nov 30. PMID: 22134360; PMCID: PMC3584811.
115. Ortiz-Montero P, Londoño-Vallejo A, Vernot JP. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal*. 2017 May 4;15(1):17. doi: 10.1186/s12964-017-0172-3. PMID: 28472950; PMCID: PMC5418812.
116. Lakota K, Hrušovar D, Ogrič M, Mrak-Poljšak K, Čučnik S, Tomšič M. Analysis of Drug Effects on Primary Human Coronary Artery Endothelial Cells Activated by Serum Amyloid A. *Mediators Inflamm*. 2018; 2018:8237209.
117. Cedó, L, Reddy ST, Mato E, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. HDL and LDL: Potential New Players in Breast Cancer Development. *J Clin Med*. 2019; 8(6):853.

118. Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, Pick-Franke P, Goulet Jr R, Badve S. SLUG/SNAI2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer*. 2010; 10:411.
119. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013; 24(6):503-13.
120. Ossoli A, Wolska A, Remaley AT, Gomaschi M. High-density lipoproteins: A promising tool against cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2022;1867(1)
121. Pirro M, Ricciuti B, Rader DJ, Catapano AL, Sahebkar A, Banach M. High density lipoprotein cholesterol and cancer: Marker or causative? *Prog Lipid Res*. 2018 Jul;71:54-69.
122. Centonze G, Natalini D, Piccolantonio A, Salemme V, Morellato A, Arina P. Cholesterol and Its Derivatives: Multifaceted Players in Breast Cancer Progression. *Front Oncol*. 2022; 12:906670.
123. Sun X-B, Liu W-W, Wang B, Yang Z-P, Tang H-Z, Lu S. Correlations between serum lipid and Ki-67 levels in different breast cancer molecular subcategories. *Oncol Lett*,. 2022; 25(2):53.
124. Rabinovich I, Sebastião APM, Lima RS, Urban CA, Junior ES, Anselmi KF, et al. Cancer stem cell markers ALDH1 and CD44+/CD24- phenotype and their prognosis impact in invasive ductal carcinoma. *Eur J Histochem*. 2018; 62(3): 2943.
125. Lee Y-M, Kim JM, Lee HJ, Seong I-O, Kim K-H. Immunohistochemical expression of CD44, matrix metalloproteinase2 and matrix metalloproteinase9 in renal cell carcinomas. *Urol Oncol*. 2019; 37(10):742-748.
126. Devrim T and Balci M. Coexistence of CD44 and Ki-67 as the prognostic markers on renal cell carcinoma. *KÜ Tıp Fak Derg* 2020; 22(1):79-88

127. Liu T, Sun B, Zhao X, Li Y, Gu Q, Dong X. OCT4 expression and vasculogenic mimicry formation positively correlate with poor prognosis in human breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(11):19634-49.
128. Gwak JM, Kim M, Kim HJ, Jang MH, Park SY. Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget.* 2017;1–14.
129. Zhou H, Hu YU, Wang W, Mao Y, Zhu J, Zhou B, Sun J. Expression of Oct-4 is significantly associated with the development and prognosis of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2015 Aug;10(2):691-696.
130. Zhang Z, Zhu Y, Lai Y, Wu X, Feng Z, Yu Y. Follicle-stimulating hormone inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the OCT4 stem cell signaling pathway. *Int J Oncol.* 2013; 43(4):1194-204
131. Abdelaziz LA, Ebian HF, Harb OA, Nosery Y, Taha HF, Nawar N. Clinical significance of cytokeratin 19 and OCT4 as survival markers in non-metastatic and metastatic breast cancer patients. *Contemp Oncol (Pozn).* 2022; 26(1):78-87.
132. Ben-Baruch A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res.* 2003; 5(1):31-6.
133. Ibrahim SA, El-Ghonaimy EA, Hassan H, Mahana N, Mahmoud MA, El-Mamlouk T, El-Shinawi M, Mohamed MM. Hormonal-receptor positive breast cancer: IL-6 augments invasion and lymph node metastasis via stimulating cathepsin B expression. *J Adv Res.* 2016 Sep;7(5):661-70. doi: 10.1016/j.jare.2016.06.007. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27482469; PMCID: PMC4957008.
134. Markkula A, Simonsson M, Ingvar C, Rose C, Jernström H. IL-6 genotype, tumour ER-status, and treatment predicted disease-free survival in a prospective breast cancer cohort. *BMC Cancer.* 2014 Oct 11;14:759. doi: 10.1186/1471-2407-14-759. PMID: 25305747; PMCID: PMC4198733.

135. Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlinchon S, Boissiere F, Laune D, et al. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 2007;9:R15.
136. Lee JS, Kim WG. Potential protective effect of ALDH-1 stromal expression against early recurrence of operable breast cancers. *Stem Cell Investig.* 2018; 29;5:43.
137. Hua S, Kittler R, White KP. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell.* 2009; 137(7):1259-71.
138. Schwartz T, Stark A, Pang J, Awuah B, Kleer CG, Quayson S. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 as a marker of mammary stem cells in benign and malignant breast lesions of Ghanaian women. *Cancer.* 2013;119(3):488-94.
139. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2011; 7(2):292-306.
140. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(10):11018-32.
141. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15(4):234-248.
142. Judd HL, Shamonki IM, Frumar AM, Lagasse LD. Origin of serum estradiol in postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 1982; 59:680–6.
143. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam, A, Dorgan, JF, Long, C, et al. Body mass index, serum sex hormones-binding globulin and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:1218-26.
144. Yamashita J, Hideshima T, Shirakusa T, Ogawa M. Primary tumor levels of interleukin-6 in relation to tumor burden in human breast-cancer. *Oncol Rep.* 1994; 1(6):1185-7.
145. Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61(24):8851-8.

8. ANEXO

Parecer do CEP/ UNICAMP:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E DE CÉLULAS TRONCO NEOPLÁSICAS (CTNs) EM MICROARRANJOS TECIDUAIS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E SUA RELAÇÃO COM A OBESIDADE

Pesquisador: SILVIA DE BARROS MAZON

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 25526819.6.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.806.097

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil. Introdução: 1.1. Câncer de Mama. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a segunda causa de morte no mundo é representada pelo câncer, sendo que o de mama se destaca por ser o segundo tipo mais frequente no mundo, correspondendo a cerca de 11% dos casos (1, 2). Em 2018, o INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) estimou 59.700 novos casos, com maior incidência em mulheres a partir de 50 anos (3), sendo que o diagnóstico tardio contribui para elevar a taxa de mortalidade (4). O câncer de mama é uma doença clínica e morfológicamente heterogênea, com mais de 20 subtipos, que diferem em grau de crescimento tumoral e potencial de metastização, sendo 80% dos tumores originados no epitélio ductal e denominados carcinoma ductal invasivo. A evolução da doença e a sobrevida do indivíduo são influenciados por características pessoais como idade, genética, nuliparidade ou primeiro filho após os 30 anos, densidade do tecido mamário (razão entre tecido glandular e adiposo), consumo de álcool, obesidade, sedentarismo e exposição à radiação ionizante (5). Os fatores prognósticos do câncer de mama que norteiam as decisões dos tratamentos são: estadiamento, tipo e grau histológico, expressão de receptores hormonais como receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

super-expressão de HER-2 (receptor do fator de crescimento epidermoide humano). A presença de RE e a super-expressão de HER-2 se consolidaram como alvos terapêuticos (6). 1.2. Câncer de Mama e Obesidade. Muitos estudos demonstram a associação do câncer de mama com a obesidade. Entre as hipóteses para explicar essa associação, figura o aumento na concentração circulante de estrógeno proveniente da aromatização de andrógenos no tecido adiposo das mulheres obesas na pós menopausa (7). Comparadas com mulheres de peso normal, obesas podem ter um aumento de até 86% nos níveis circulantes de estradiol, 60% de estrona e 20% de testosterona (8). Muitos subtipos de câncer de mama possuem RE nas células tumorais e já foi observado que esse hormônio estimula o crescimento do tumor ao aumentar a proliferação celular e inibir a apoptose, além de promover a metástase (9). Todavia, a capacidade de responder à ação deste hormônio é dependente não só da presença, mas também da concentração de RE nas células tumorais (10). Uma outra hipótese leva em consideração a associação da obesidade com a síndrome metabólica e fatores de crescimento insulina-like (IGFs). Um desses fatores, o IGF-1, atua na proliferação, migração e formação de metástase. Por outro lado, parte da ação dos IGFs também poderia ser mediada pelo cross-talk dessa via com a via do receptor de estrógeno nas células mamárias (11). Inclusive, já foi observada ação sinérgica entre IGF-1 e estradiol (12). Por sua vez, a hiperinsulinemia decorrente da síndrome metabólica reduz os níveis da globulina ligadora de hormônios sexuais e, com isso, promove o aumento da biodisponibilidade do estrógeno (8). Alternativamente, os adipócitos e suas funções autócrina, parácrina e endócrina estão no centro do cenário, em consonância com o reconhecimento do tecido adiposo como um órgão endócrino (13). O tecido adiposo é capaz de produzir dezenas de diferentes tipos de adipocinas, citocinas e quimiocinas, influenciando o metabolismo e o sistema imunológico. Na presença de obesidade, a hipertrofia dos adipócitos direciona parte deles para a apoptose, o que faz com que macrófagos sejam enviados para a região e iniciem um processo inflamatório de baixo grau, que resulta na lipólise e liberação de lipídios pelos adipócitos no local (14). Como resposta à inflamação associada à obesidade, o tecido adiposo promove um aumento na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-), interleucina 1 (IL-1), IL-6, proteína C reativa (PCR) e amiloide sérica A (SAA), assim como eleva a produção de leptina, que é angiogênica e mitogênica (8,15). O desenvolvimento do câncer mamário pode ser influenciado pela inflamação crônica local, onde citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas moduladoras do sistema imunológico participam da instalação do tumor e da progressão da doença. Entre as citocinas e proteínas de fase aguda que se apresentam elevadas no câncer de mama, destacam-se a IL-6, TNF- e SAA. Essas moléculas estão elevadas não só em níveis séricos, como também têm demonstrado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

participação efetiva na causa e/ou evolução da doença (16,17). Desta forma, as citocinas pró-inflamatórias representam um papel fundamental na associação entre a inflamação crônica e a transformação maligna, participando das principais vias existentes entre a inflamação e a promoção/progressão do tumor. A IL-6 atua na regulação fisiológica de vários processos tais como o crescimento e a diferenciação de células B e T, na formação de colônias de células hematopoiéticas pluripotentes e também na expressão hepática de proteínas de fase aguda como a PCR e a SAA (18). Atua também nos processos de apoptose, angiogênese e proliferação e pode ter ação pró-tumorigênica pelo seu efeito pró-inflamatório e pró-angiogênico, inclusive no câncer de mama, onde níveis aumentados dessa interleucina estão relacionados a um pior prognóstico (19). Na presença de tumor, a IL-6 inibe a apoptose das células tumorais e, no carcinoma ductal de mama, ela foi relacionada com a promoção e a progressão do tumor (20). A responsividade do tumor mamário à IL-6 é diretamente aumentada pela quantidade de RE ou RP presentes no tumor (21). Por sua vez, o TNF- participa da regulação da apoptose e possui ação anti e pró-tumorigênica. Como promotor tumoral, o TNF- está associado à inflamação crônica e induz o aumento da IL-6 (18). Assim como a IL-6, o TNF- foi relacionado com a promoção e a progressão do carcinoma ductal de mama. Sua presença no tumor promove o crescimento e a migração tumoral. Níveis séricos elevados de TNF- são indicadores de pior estágio tumoral e metástase em linfonodos (20). Tanto o TNF- e a IL-6 estimulam o aumento do estrógeno sérico, intratumoral e no tecido adiposo, o que acelera o crescimento de tumores RE+ (21). Esse mecanismo de ação é aumentado pela obesidade, onde o TNF- e a IL-6 estimulam a atividade da aromatase no tecido adiposo (8). Quanto à SAA, esta tem sua expressão hepática estimulada pela IL-1, IL-6 e TNF-. Níveis séricos elevados de SAA estão relacionados com doenças inflamatórias e alguns tumores, onde pode causar a tumorigênese e a metástase (22). A inflamação está associada à tumorigênese e a SAA quimioatrai monócitos, linfócitos e granulócitos, aumentando a inflamação local e predispondo o tecido à malignidade. A SAA induz a produção de citocinas inflamatórias como o TNF-, IL-1 e IL-6 (23,24). Já foi observada a correlação entre a presença de níveis aumentados de SAA e uma maior densidade mamográfica, o que é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama. A mesma associação foi feita com níveis elevados de IL-6 e TNF- (25). Também é possível fazer uma correlação entre os níveis de SAA e o estadiamento do tumor. Os níveis aumentados de SAA presentes nas neoplasias são relacionados com um pior prognóstico da doença, inclusive no câncer de mama. Além de sua ação inflamatória, a SAA age como uma matriz extracelular de adesão de proteínas oferecendo suporte para a difusão e migração celular, colaborando com a promoção e progressão tumoral (26). A presença de SAA em macrófagos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

associados ao tumor está relacionada com tumores maiores e de maior grau histológico. Em câncer de mama, níveis elevados de SAA estão relacionados a um maior acometimento de linfonodos assim como a uma maior recorrência e letalidade da doença (24). Em mulheres na pós-menopausa e com câncer de mama, nosso grupo observou a associação entre a obesidade e níveis elevados de SAA, tendo sido encontrados maiores níveis em tumores RE-, considerados de pior prognóstico (27).

1.3. Microambiente Tumoral e CTNs. Os tumores já foram descritos como lesões que nunca cicatrizam devido às semelhanças entre os mecanismos do estroma que propiciam a promoção e a progressão tumoral e a recuperação de um estroma saudável após uma lesão. Nas duas situações, ocorre a super-expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o que causa o aumento de permeabilidade vascular. Porém, ao contrário do processo cicatricial que tem produção de VEGF momentânea, o estroma tumoral tem produção contínua de VEGF, que induz a permeabilidade vascular crônica, reprograma as células endoteliais para um estado proliferativo e protegido contra a apoptose, além de favorecer a angiogênese, sendo que a soma desses fatores cria um ambiente pró-tumorigênico (28). Neste contexto, a inflamação crônica assume importante papel, podendo favorecer a gênese tumoral. Inicialmente, citocinas pró inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio causam alterações epigenéticas nas células pré malignas e silenciam os genes supressores tumorais. A seguir, citocinas e quimiocinas atuam na sobrevivência e na proliferação das células neoplásicas. Macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos recrutados pelos fatores próinflamatórios passam a fazer parte do estroma tumoral, onde participam do aumento e da manutenção da inflamação, promovendo o crescimento do tumor e a possibilidade de invasão. Esse ciclo se repete sucessivamente, mantendo a inflamação crônica e favorecendo o tumor (29). Além disso, o microambiente tumoral, rico em citocinas pró-inflamatórias, pode proporcionar o surgimento de células tronco neoplásicas (CTNs) (30,31). As CTNs são assim denominadas pelas suas características semelhantes às células tronco normais, como a capacidade de auto-renovação, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, inibição da apoptose e a habilidade de migrar, que no caso das CTNs implica em gerar metástase (32). O termo CTN surgiu em 2001 através do estudo de células de leucemia mielóide aguda e, posteriormente, foi comprovado um importante papel desempenhado pelas CTNs na promoção do câncer e a sua capacidade de proporcionar a reincidência (33,34). As CTNs podem se originar a partir de células somáticas que se tornaram desdiferenciadas ou a partir de células tronco normais que sofreram mutação (35) e têm sido encontradas em vários tipos de tumores sólidos, incluindo os de: pâncreas (36), fígado (37), pituitária (38), cólon e reto (39), pulmão (40), rim (41), cérebro (42), próstata (43) e mama (44). As CTNs mamárias podem ser caracterizadas de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

acordo com a expressão de moléculas de superfície tais como: alta expressão de CD44 (CD44high), ausência ou baixa expressão de CD24 (CD24 /low) e altas concentrações da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (45,46). Além disso, as CTNs apresentam ausência de expressão de linhagem (lineage-), deixando de expressar CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD64 e CD140b (47). Além da expressão elevada de CD44, as CTNs mamárias também podem possuir uma grande quantidade de antígeno epitelial específico (ESA) em sua superfície, que pode ser utilizado para facilitar o isolamento celular e indica alto potencial tumorigênico, o que acarreta um pior prognóstico. Apesar do fenótipo ESA+/CD44+/CD24-/low, ser bastante comum, já foram identificados vários tipos de CTNs mamárias, cada qual com sua variação de expressão de antígenos. Como a expressão aumentada da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) pode ser associada com o estadiamento do tumor (48), sua atividade passou a ser avaliada e se tornou uma forma efetiva de identificar CTNs mamárias (49). A presença de ALDH nas CTNs é característica de tumores mais agressivos e de pior prognóstico, sendo o fenótipo ALDH+/CD44+/CD24-/low o de CTNs com maior capacidade de autorrenovação, proliferação, invasão e potencial tumorigênico (50–53). Evidências crescentes sugerem também que CTNs mamárias são resistentes à quimio e à radioterapia. Células de câncer mamário CD44high/CD24/low/ESA+ mostraram maior resistência a agentes quimioterápicos (paclitaxel e 5-fluorouracil) quando comparadas às células tumorais presentes na massa tumoral (54). O motivo pelo qual essa resistência ocorre ainda não foi elucidado, merecendo análises mais aprofundadas do microambiente tumoral, bem como das características das pacientes como um todo. Nesse sentido, considerando a influência da inflamação sobre a gênese e manutenção das CTNs mamárias, poderíamos considerar que em pacientes com sobrepeso/obesidade, com resposta inflamatória patente, poderia haver maior frequência de CTNs no microambiente tumoral. Hipótese Tendo em vista a relação entre CTNs e resposta inflamatória, resposta inflamatória e obesidade, espera-se encontrar em microarranjos teciduais de espécimes cirúrgicos de pacientes com sobrepeso/obesidade, maior frequência de expressão de marcadores de inflamação e de CTNs. Além disso, espera-se encontrar associação da expressão tecidual de CTNs com concentrações séricas mais elevadas de marcadores inflamatórios e outros marcadores/indicadores de obesidade, bem como com características clínico-patológicas de pior prognóstico. Metodologia Proposta 1. Tamanho Amostral. A amostra será constituído por 4 conjuntos de microarranjos teciduais: epitélio tumoral (T), não tumoral (NT), gordura próxima ao tumor (GP) e gordura distante do tumor (GD), procedentes de espécimes cirúrgicos de 120 pacientes. Os microarranjos teciduais (TMA - do inglês, Tissue Microarray), já estão prontos. Estes foram construídos em pesquisa anterior, aprovada pelo CEP (824/2011). 2.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

Investigação da Expressão de Marcadores de Inflamação e de CTNs, por Imunoistoquímica. As expressões dos marcadores de inflamação, TNF- e IL-6, e de CTNs, Oct4 e ALDH1, serão investigadas nos quatro diferentes TMAs, por análise imunoistoquímica, com utilização de anticorpos específicos e revelação pelo ADVANCE™ HRP Detection System. Secções seriadas de cada TMA, não incubadas com o anticorpo primário, serão utilizadas como controles negativos. Os controles positivos adequados para cada marcador serão realizados a cada bateria de reação. A detecção e a quantificação automática das reações imunoistoquímicas serão feitas por meio do scanner de lâminas Aperio (Leica), equipado com o software Image Scope. Os resultados de positividade serão expressos em % de células positivas para cada marcador. Obs.: Características dos anticorpos anti-marcadores de células tronco neoplásicas (CTNs) e de inflamação: Anti-Marcadores de CTNs: Anti-Oct4: clone: GT486; origem: camundongo; fabricante: Abcam; controle (+): células-tronco embrionárias Anti-ALDH1 : clone: 1/1381; origem: camundongo; fabricante: Abcam; controle (+): carcinoma de cólon Anti-Marcadores inflamatórios: Anti-IL-6: policlonal; origem: coelho; fabricante: Abcam; controle (+): fígado Anti-TNF-: clone: 2C8; origem: camundongo; fabricante: Novus Biologicals; controle (+): linfonodo 3. Avaliação da associação dos resultados de expressão tecidual com outros marcadores séricos e teciduais, com as características clinicopatológicas da doença, com parâmetros bioquímicos e com indicadores antropométricos de obesidade. Para a análise das possíveis associações entre as expressões teciduais e outros dados relevantes, será realizada coleta dos dados de interesse diretamente dos bancos de dados das pacientes com câncer de mama, em fase pré- ou pós-menopausa, incluídas nos estudos anteriores (CEP782/2009 e 824/2011, com respectivos adendos), e classificadas em dois grupos: grupo sobrepeso/obesidade (SP/O), composto por pacientes com IMC 25 kg/m² e circunferência abdominal (CA) > 88 cm e grupo de não obesas (NO) com IMC a 18,5 a 24,99 kg/m² e CA 88 cm. Dados que serão coletados: idade, etnia, IMC, CA, tempo de menopausa, tipo histológico da neoplasia, grau de diferenciação, estadiamento clinicopatológico, status de receptores hormonais e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), expressões teciduais de SAA, FABP4, adiponectina e seus receptores, concentrações séricas de SAA, IL6, TNF-, FABP, adiponectina e parâmetros bioquímicos (colesterol total (Col-T) e frações (LDL-Col, HDL-Col), triglicerídeos (TG) e glicemia (Gli)), no pré-operatório. 4. Análise Estatística. Com base nas pesquisas anteriores, as análises de variáveis contínuas deverão ser realizadas por métodos não paramétricos. As frequências de marcadores inflamatórios e de CTNs entre os grupos serão comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As correlações entre as variáveis numéricas serão realizadas pelo teste de Spearman e as associações com variáveis categóricas, pelo teste x² ou

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

exato de Fisher. Todas as análises serão realizadas utilizando-se o programa estatístico Prisma 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). O valor de p inferior a 0,05 será considerado como estatisticamente significativo. Metodologia de Análise de Dados: Com base em pesquisa anterior correlacionada, as análises de variáveis contínuas deverão ser realizadas por métodos não paramétricos. As frequências de marcadores inflamatórios e de CTNs entre os grupos serão comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As correlações entre as variáveis numéricas serão realizadas pelo teste de Spearman e as associações com variáveis categóricas, pelo teste χ^2 ou exato de Fisher. Todas as análises serão realizadas utilizando-se o programa estatístico Prisma 5.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). O valor de p inferior a 0,05 será considerado como estatisticamente significativo. Desfecho Primário: Detectar associação dos marcadores de inflamação e de CTNs com características clínico patológicas de pior prognóstico e/ou com a obesidade. Desfecho Secundário: Detectar diferenças de expressão de marcadores de inflamação e de CTNs entre os diferentes microarranjos teciduais de espécimes cirúrgicos de pacientes com câncer de mama.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a presença de marcadores inflamatórios e de CTNs em microarranjos teciduais de espécimes cirúrgicos de pacientes com câncer de mama e sua correlação com as características clínico patológicas da doença, bem como com parâmetros antropométricos, bioquímicos e inflamatórios associados à obesidade. Objetivo Secundário:

Objetivos Específicos 1. Avaliar as frequências de expressões de marcadores de inflamação e de CTNs nos quatro diferentes microarranjos teciduais dos diferentes grupos de pacientes. 2. Avaliar a associação de expressões de marcadores de inflamação e de CTNs nos diferentes microarranjos teciduais, com as características clínico -patológicas da doença. 3. Avaliar a correlação de expressões de marcadores de CTNs e marcadores inflamatórios, nos diferentes microarranjos teciduais. 4. Avaliar a correlação de expressões de marcadores de CTNs com as concentrações séricas de IL-6, TNF-, SAA, adiponectina, FABP e indicadores antropométricos da obesidade. 5. Avaliar a correlação de expressões de marcadores de CTNs nos diferentes microarranjos teciduais, com o perfil lipídico e com a glicemia das pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos para as participantes são mínimos, considerando-se que não haverá qualquer tipo de intervenção ou uso indevido de material biológico ou informações pessoais, garantindo-se

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

o sigilo e a divulgação dos resultados ao término da pesquisa.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos e imediatos para as participantes. Entretanto, os resultados desta pesquisa poderão trazer contribuições importantes para um melhor conhecimento da fisiopatologia do câncer de mama, que poderão repercutir na prevenção e/ou em novas estratégias terapêuticas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este protocolo, proposto pela Faculdade de Ciências Médicas (FCM) / UNICAMP, refere-se ao projeto de Mestrado, "Investigação da expressão de marcadores de inflamação e de células tronco neoplásicas (CTNs) em microarranjos teciduais de pacientes com câncer de mama e sua relação com a obesidade", a ser desenvolvido por Izabel Cristina da Rocha Leão Crivelli Nunes da Silva sob a orientação de Silvia de Barros Mazon (responsável pela submissão). O projeto tem por objetivo avaliar a presença de marcadores de células-tronco neoplásicas e de inflamação em microarranjos teciduais construídos a partir de amostras de tecido mamário incluído em parafina, obtido cirurgicamente de pacientes com câncer de mama. Os microarranjos teciduais foram compostos previamente a partir de material biológico obtido em projetos anteriores (CEP 824/2011 e 782/2009). Neste estudo, pretende-se investigar uma possível correlação entre expressão desses marcadores, com como com parâmetros inflamatórios, antropométricos e bioquímicos associados a obesidade que foram avaliados nos estudos prévios, com base em resultados da literatura que apontam relação entre obesidade e inflamação, e entre esta última e oncogênese. Espera-se que os resultados permitam maior compreensão da fisiopatologia do câncer de mama, com consequências positivas sobre a prevenção e o tratamento da doença.

Em resposta a pendências esclarece:

Histórico: APRESENTADO NA CARTA RESPOSTA. 1) Os microarranjos teciduais (TMAs, do inglês tissue microarray) foram compostos previamente, a partir de materiais biológicos procedentes de blocos de parafina confeccionados originalmente para a análise de rotina de material cirúrgico das pacientes arroladas no projeto anterior (CEP 824/2011). Na ocasião houve solicitação e aprovação de dispensa de TCLE (vide Parecer CEP 824/2011), por se tratar de um estudo retrospectivo, ao se considerar que não haveria nova coleta de material, tendo em vista que a confecção dos TMAs seria realizada a partir de blocos de parafina rotineiramente confeccionados para fins diagnósticos. Este projeto teve como objetivo a investigação da expressão de alguns marcadores teciduais e teve um adendo aprovado para a inclusão da análise de outros marcadores

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

relacionados. Este projeto deu origem a um banco de dados com resultados teciduais. Posteriormente houve solicitação de transferência de responsabilidade do projeto e guarda do material, que gerou a emenda aprovada pelo CEP/UNICAMP em 24/07/2018. 2) As pacientes arroladas no projeto CEP 824/2011 também participaram do projeto anterior aprovado pelo CEP (782/2009), cujo objetivo foi a avaliação de vários parâmetros séricos e antropométricos ligados à obesidade e sua relação com o câncer mamário. Este projeto previa a coleta de sangue das pacientes para a quantificação de vários marcadores séricos e teve TCLE aprovado. Posteriormente teve um adendo aprovado para inclusão de pacientes em fase pré-menopausa e com outras patologias mamárias. Houve modificação do TCLE quanto ao título do projeto e adaptação de um segundo TCLE para as pacientes com outras patologias mamárias e pacientes. Este projeto deu origem a um banco de dados com resultados séricos (de vários marcadores) e antropométricos. 3) O atual estudo pretende investigar a expressão de novos marcadores teciduais pela análise imunistoquímica de TMAs (confeccionados no projeto 824/2011). Além disso pretende investigar a possível correlação entre a expressão de marcadores teciduais e os parâmetros inflamatórios, antropométricos e bioquímicos originados no projeto 782/2009, que serão coletados do respectivo banco de dados.

Serão utilizados Tissue Microarray (TMAs) já confeccionados e que tiveram sua aprovação pelo parecer CEP824/2011, com emenda subsequente relativa à responsabilidade do projeto e guarda do material, aprovada pelo CEP/UNICAMP em 24/07/2018. - altera cronograma: a pesquisa será realizada em 12 meses e declara que só será iniciada após aprovação do CEP. - Inclui item "5. Construção dos Microarranjos de Tecidos - Tissue Microarray (TMA) (Aprovado pelo CEP: Parecer 824/2011 e adendo). - Refere que o projeto original e emenda deu origem a um banco de dados com resultados teciduais que Posteriormente houve solicitação de transferência de responsabilidade do projeto e guarda do material, que gerou a emenda aprovada pelo CEP/UNICAMP em 24/07/2018. - Os parâmetros inflamatórios, antropométricos e bioquímicos originados no projeto 782/2009, formaram um banco de dados que serão coletados para o presente estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória, submetidos em 12/11/19:

1 - Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos (arquivo "Folhaderosto_projeto_lzabelCNS_SilviaBM.pdf"), preenchida, datada e assinada: adequada.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

2 - Projeto de Pesquisa: Foram analisados os documentos "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1397262.pdf" e "PROJETO_MESTRADO_IzabelCRLCNunes_da_Silva_SBM.pdf": Adequado, mas é necessária a constituição de bio-repositório (ver "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações").

3 - Orçamento financeiro e fontes de financiamento (arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1397262.pdf"): adequado.

4 - Cronograma: consta do arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1397262.pdf": adequado.

5 - Termo de Consentimento: está sendo solicitada dispensa de TCLE, que é considerada justificável e adequada. Ver "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

6 - Currículos: links para os currículos Lattes dos membros da equipe foram inseridos na página-rostro do projeto.

7- Outros documentos que acompanham a submissão: comprovação de vínculo institucional da responsável pelo projeto ("IDFuncional_Silvia_de_Barros_Mazon.pdf").

-- doc2_Parecer824_2011_Adendo_e_Emenda.pdf 10/12/2019: apresenta o parecer de aprovação do projeto original 824/2011 e dois adendos

-- PROJETO_MESTRADO_IzabelCRLCrivelli_Silva_SBM_Destaques_Pendencias_CEP.pdf 10/12/2019: com destaque nas alterações.

Para adequação de pendências:

- doc6_Biorrepositorio_corrigido_07012020.docx:07/01/2020: com adequações.

- doc5_parecerCEP_projeto824_2011_07012020.pdf:07/01/2020: parecer do projeto original onde foram coletadas as amostras, com dispensa do TCLE.

- doc4_parecerCEP_emenda2018_projeto824_2011_07012020.pdf 07/01/2020: parecer de aprovação da emenda onde o projeto é transferido para a pesquisadora atual.

- CARTA_RESPOSTA_2_07012020.docx:07/01/2020:

Recomendações:

Orientamos que atualmente um projeto que pretenda armazenar dados e ou material biológico deve apresentar essa informação no projeto e solicitar anuência do participante no TCLE. Deve ainda apresentar uma regulamentação de como esse material será armazenado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração as pendências do parecer anterior Número do Parecer: 3.787.783 de 20 de Dezembro de 2019:

- adequa documento do biorrepositório;
- apresenta parecer de aprovação do projeto originário das amostras. Com dispensa do TCLE.
- apresenta parecer de aprovação da emenda onde a pesquisadora atual assume a pesquisa anterior.

O estudo prévio 782/2009 (onde foram coletadas as amostras) não apresentava em seu TCLE nenhuma solicitação, ou informação, de que haveria armazenamento de material biológico ou de dados para utilização para estudos futuros.

O estudo 824/2011 (onde foram construídos os TMAs) só foi concebido em 2011 (projeto 824/2011 e adendo) para o qual se solicitou dispensa de apresentação de TCLE.

Conclusão: projeto aprovado.

Orientamos que atualmente um projeto que pretenda armazenar dados e ou material biológico deve apresentar essa informação no projeto e solicitar anuência do participante no TCLE. Deve ainda apresentar uma regulamentação de como esse material será armazenado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1397262.pdf	07/01/2020 18:18:25		Aceito
Outros	doc6_Biorrepositorio_corrigido_07012020.docx	07/01/2020 18:16:48	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	doc5_parecerCEP_projeto824_2011_07012020.pdf	07/01/2020 18:16:15	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	doc4_parecerCEP_emenda2018_projeto824_2011_07012020.pdf	07/01/2020 18:15:09	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_2_07012020.docx	07/01/2020 18:14:11	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	10/12/2019 04:35:06	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	doc3_Parecer782_2009_e_TCLE_Aden do e TCLEs modificados.pdf	10/12/2019 04:32:14	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	doc2_Parecer824_2011_Aden do e Emenda.pdf	10/12/2019 04:30:41	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Outros	doc1_Biorrepositorio.docx	10/12/2019 04:28:16	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.806.097

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MESTRADO_IzabelCRLCriv elli_Silva_SBM_Destaques_Pendencias CEP.pdf	10/12/2019 04:24:39	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_projeto_IzabelCNS_Silvia BM.pdf	12/11/2019 12:26:23	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito
Declaração de Pesquisadores	IDFuncional_Silvia_de_Barro_Mazon.p df	12/11/2019 12:22:06	SILVIA DE BARROS MAZON	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 22 de Janeiro de 2020

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br