

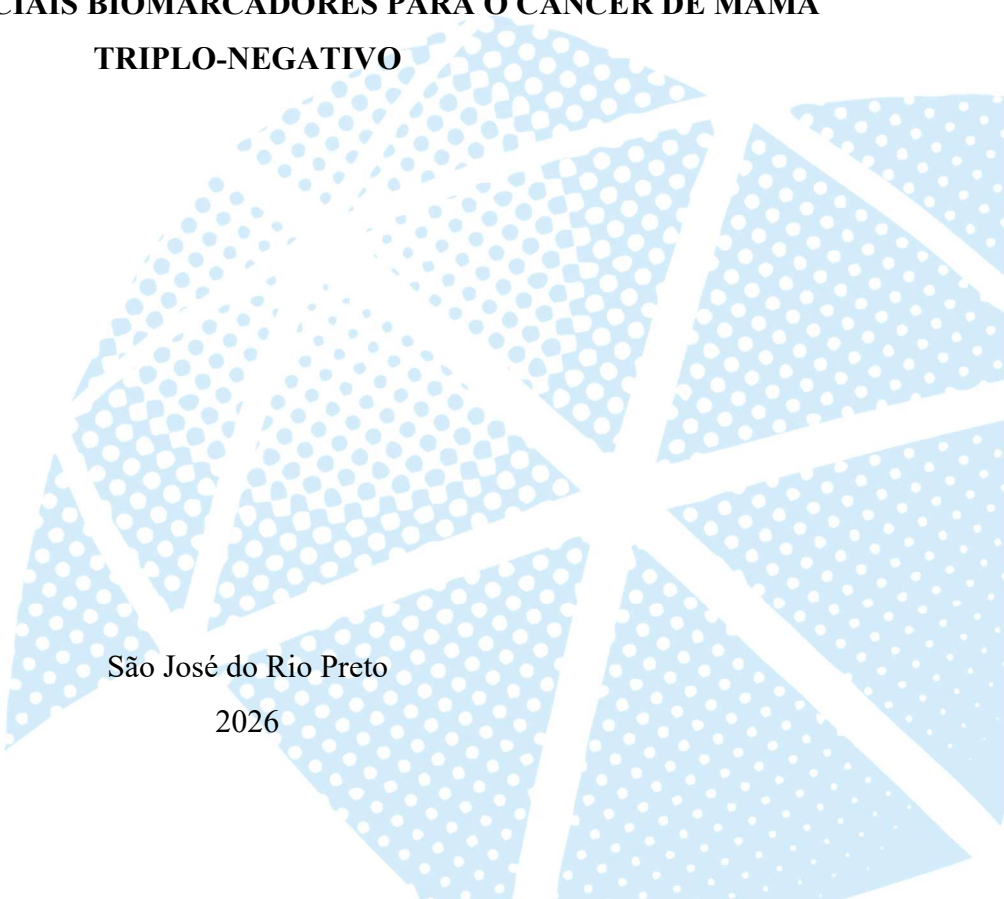
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto

DÉBORA DE LIMA ALVES

**VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES H2A E
CSTA COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA O CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO**

São José do Rio Preto

2026



DÉBORA DE LIMA ALVES

**VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES H2A E
CSTA COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA O CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestra em Biociências.

Área de Concentração: Genética e Biologia Evolutiva

Orientadora: Profª. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto

2026

A474v

Alves, Débora de Lima

Validação das proteínas de vesículas extracelulares H2A e CSTA
como potenciais biomarcadores para o câncer de mama triplo-negativo
/ Débora de Lima Alves. -- São José do Rio Preto, 2026
89 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto

Orientadora: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. Mamas Câncer. 2. Marcadores bioquímicos. 3. Proteínas. 4.
Vesículas extracelulares. 5. Imuno-histoquímica. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este estudo contribui para o avanço do conhecimento sobre o câncer de mama triplo-negativo ao integrar a análise de vesículas extracelulares circulantes e a validação em tecido tumoral, ampliando a compreensão dos mecanismos moleculares associados à progressão e heterogeneidade tumoral. Do ponto de vista científico e tecnológico, os resultados evidenciam as proteínas histona H2A e cistatina A como potenciais biomarcadores associados ao fenótipo mais agressivo do câncer de mama em tecido tumoral, ao mesmo tempo em que evidenciam limitações de sua detecção em vesículas extracelulares, fornecendo informações relevantes para o aprimoramento da biópsia líquida. Em termos de impacto social e de saúde pública, os achados podem auxiliar no desenvolvimento de abordagens mais precisas para o diagnóstico e o monitoramento clínico, especialmente em subtipos tumorais mais agressivos. No âmbito educacional e formativo, o estudo fortalece a formação científica em técnicas de biologia molecular, proteômica e imuno-histoquímica. Além disso, o trabalho se insere no contexto nacional da pesquisa em oncologia molecular, abordando temas relevantes, como biomarcadores tumorais e biópsia líquida, e contribuindo para o avanço científico, a inovação e o desenvolvimento sustentável da pesquisa.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This study contributes to advancing knowledge about triple-negative breast cancer by integrating the analysis of circulating extracellular vesicles with validation in tumor tissue, thereby broadening our understanding of the molecular mechanisms associated with tumor progression and heterogeneity. From a scientific and technological perspective, the results highlight the histone H2A and cystatin A proteins as potential biomarkers associated with the most aggressive phenotype of breast cancer in tumor tissue, while also highlighting limitations in their detection in extracellular vesicles, providing relevant information for improving liquid biopsy. In terms of social and public health impact, the findings may aid in the development of more precise approaches to diagnosis and clinical monitoring, especially for more aggressive tumor subtypes. In the educational and training context, the study strengthens scientific training in molecular biology, proteomics, and immunohistochemistry techniques. Furthermore, the study fits into the national context of molecular oncology research, addressing relevant topics such as tumor biomarkers and liquid biopsy, and contributing to scientific advancement, innovation, and the sustainable development of research.

DÉBORA DE LIMA ALVES

**VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES H2A E
CSTA COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA O CÂNCER DE MAMA
TRIPLO-NEGATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Área de Concentração: Genética e Biologia Evolutiva

Data da defesa: 17/08/2026

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Dorotéia Rossi da Silva Souza
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Dedico este trabalho à minha família, por todo o apoio e incentivo ao longo da minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Agradeço por ter me capacitado durante esta etapa, por ter me dado forças e por ter me sustentado nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão pela paciência e pelo apoio incessante ao longo de toda a minha vida, sempre me incentivando a seguir em frente. Em especial, agradeço aos meus pais pela formação pessoal, por acreditarem em mim em todos os momentos e por nunca medirem esforços pessoais, físicos ou financeiros, para que eu pudesse sonhar e viver tudo isso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Debora Zuccari, pela confiança depositada em mim desde o início. Obrigada pelo carinho, pelo acolhimento e por me permitir aprender e crescer tanto ao longo desses dois anos. Sua paixão e dedicação à pesquisa, mesmo diante das dificuldades, serão sempre exemplos a serem seguidos por mim. Sem seu apoio e seus ensinamentos, não seria possível a realização deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Jaqueline e Barbara, por dividirem diariamente a vivência no laboratório e tornarem a jornada mais leve e divertida. Obrigada por compartilharem as dificuldades, os medos e as angústias, mas também as risadas e as alegrias nos dias em que mais precisávamos. Estarei com vocês em todas as conquistas, torcendo pelo sucesso de cada uma e auxiliando no que eu puder sempre que precisarem.

À Laura, agradeço, além das palavras acima, pelo acolhimento, pela companhia e pelo apoio desde o início. Obrigada pela paciência e pela disponibilidade para me ensinar, por compartilhar seu conhecimento e por me auxiliar sempre que precisei. Obrigada também por confiar em mim para ajudá-la, ensiná-la e apoiá-la, e pela amizade que construímos. Estarei sempre por perto para acompanhar suas conquistas e seu sucesso.

À Dra. Caroline Patini de Rezende, por toda a sua dedicação a mim, ao meu projeto e ao meu aprendizado. Obrigada pela generosidade, dedicação e paciência ao ensinar com maestria coisas que eu nunca imaginei que aprenderia e seria capaz de executar, e por sempre me mostrar que sou capaz. Obrigada pela amizade que construímos, por podermos compartilhar diversos momentos de nossas vidas, e por me permitir crescer não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa. Torço pelo seu sucesso e pelo seu futuro, que certamente será brilhante.

Agradeço a todos os demais amigos e colegas que, em diferentes momentos e etapas, fizeram parte dessa jornada comigo.

À técnica de enfermagem Deia, do Hospital de Base de São José do Rio Preto, por todo o auxílio durante a análise das pacientes e, principalmente, na coleta de amostras.

A todas as pacientes e aos indivíduos que participaram deste estudo, por permitirem conhecer um pouquinho da vida de cada um. Obrigada pela disponibilidade de tempo e pela doação das amostras. Espero que este trabalho possa, de alguma forma, contribuir agora ou futuramente, para suas vidas e para as de outras pessoas que passarão por situações semelhantes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, ao IBILCE e à Secretaria de Pós-graduação.

Ao Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises (CMMicro) e ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela disponibilização da infraestrutura e dos equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, bem como pelo suporte prestado durante a realização das análises.

Ao Laboratório de Glicobioquímica e Doenças Infecciosas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), em especial ao Prof. Dr. Fausto Almeida, ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Transmissão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Amor de Barretos, pela colaboração nas etapas de isolamento e caracterização das vesículas extracelulares.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) é considerado um dos subtipos mais agressivos de câncer de mama (CM), caracterizado pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Essa característica limita as opções terapêuticas e contribui para um prognóstico menos favorável, além de dificultar a identificação precoce da doença por meio de biomarcadores específicos. Nesse contexto, a busca de novos marcadores moleculares capazes de auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento clínico do CMTN torna-se essencial. A biópsia líquida, que consiste na análise de fluidos biológicos para a detecção de moléculas, constitui uma abordagem promissora por ser um método de caráter minimamente invasivo e permitir o monitoramento dinâmico da doença. Entre os componentes detectáveis, destacam-se as vesículas extracelulares (VEs), estruturas que carregam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos representativos de sua célula de origem e que têm sido investigadas como fontes de biomarcadores em diferentes tipos de câncer. Entre as proteínas identificadas em VEs, a histona H2A (H2A) e a cistatina A (CSTA) despertam interesse por sua possível associação com processos relacionados à tumorigênese. A H2A participa da organização da cromatina e da regulação da expressão gênica, podendo refletir alterações epigenéticas presentes em células tumorais. Já a CSTA atua como inibidora de proteases cisteínicas, participando de processos ligados à remodelação tecidual, invasão celular e progressão tumoral. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão das proteínas H2A e CSTA em VEs isoladas do plasma de pacientes e em amostras de tecido tumoral mamário, investigando seu potencial como biomarcadores para o CMTN. Foram coletadas amostras de 159 pacientes entre outubro de 2024 e julho de 2025 e, ao final, 150 foram elegíveis: 12 controles, 85 com lesões benignas e 53 com tumores malignos (15 Luminal A, 19 Luminal B, 6 HER2+ e 13 CMTN). As amostras foram organizadas em 21 *pools*. As VEs foram analisadas por meio de ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), e os tecidos tumorais foram avaliados por imuno-histoquímica. A quantificação por ELISA revelou diferenças estatisticamente significativas para ambas as proteínas, sendo a CSTA mais expressa no grupo Triplo-negativo em relação aos grupos Luminal A ($p = 0,0055$) e Benigno ($p = 0,0022$), e a H2A maior em relação aos grupos Luminal B ($p = 0,0186$), Benigno ($p = 0,0018$) e Controle ($p = 0,0280$). Na análise imuno-histoquímica, a CSTA apresentou maior expressão no grupo Triplo-negativo em comparação a todos os demais grupos ($p < 0,0001$). A H2A apresentou maior expressão em relação aos grupos Luminal A ($p = 0,0484$) e Benigno ($p = 0,0046$), com predomínio de marcação nuclear e citoplasmática

maior em comparação ao grupo Luminal B ($p = 0,0203$). Em conjunto, os resultados indicam que as proteínas CSTA e H2A apresentam padrões de expressão associados ao CMTN, sugerindo potencial como candidatas a biomarcadores, embora estudos adicionais sejam necessários para confirmar o potencial diagnóstico e a aplicabilidade como biomarcadores.

Palavras-chave: neoplasias da mama; neoplasias de mama triplo-negativas; biópsia líquida; biomarcadores; vesículas extracelulares.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is considered one of the most aggressive subtypes of breast cancer (BC), characterized by the absence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression. These characteristics limit treatment options and contribute to a less favorable prognosis, in addition to hindering the early identification of the disease through specific biomarkers. In this context, the search for new molecular markers capable of aiding in the diagnosis and clinical monitoring of TNBC becomes essential. Liquid biopsy, which involves the analysis of biological fluids to detect molecules, is a promising approach because it is a minimally invasive method that allows for dynamic monitoring of the disease. Among the detectable components, extracellular vesicles (EVs) stand out; these are structures that carry proteins, lipids, and nucleic acids representative of their cell of origin and have been investigated as sources of biomarkers in different types of cancer. Among the proteins identified in EVs, histone H2A (H2A) and cystatin A (CSTA) are of particular interest due to their potential association with processes related to tumorigenesis. H2A plays a role in chromatin organization and gene expression regulation and may reflect epigenetic alterations present in tumor cells. CSTA, on the other hand, acts as a cysteine protease inhibitor, playing a role in processes related to tissue remodeling, cellular invasion, and tumor progression. Given this, the present study aimed to evaluate the expression of the H2A and CSTA proteins in VE cells isolated from patient plasma and in breast tumor tissue samples, investigating their potential as biomarkers for TNBC. Samples were collected from 159 patients between October 2024 and July 2025, and ultimately, 150 were eligible: 12 controls, 85 with benign lesions, and 53 with malignant tumors (15 Luminal A, 19 Luminal B, 6 HER2+, and 13 TNBC). The samples were organized into 21 pools. The EVs were analyzed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the tumor tissues were evaluated by immunohistochemistry. ELISA quantification revealed statistically significant differences for both proteins, with CSTA being more highly expressed in the triple-negative group compared to the Luminal A ($p = 0.0055$) and Benign ($p = 0.0022$) groups, and H2A was higher compared to the Luminal B ($p = 0.0186$), Benign ($p = 0.0018$), and Control ($p = 0.0280$) groups. In the immunohistochemical analysis, CSTA showed higher expression in the Triple-negative group compared to all other groups ($p < 0.0001$). H2A showed higher expression compared to the Luminal A ($p = 0.0484$) and Benign ($p = 0.0046$) groups, with a predominance of nuclear and cytoplasmic staining that was greater than in the Luminal B group ($p = 0.0203$). Taken together, the results indicate that the CSTA and H2A proteins

exhibit expression patterns associated with TNBC, suggesting their potential as biomarker candidates; however, further studies are needed to confirm their diagnostic potential and applicability as biomarkers.

Keywords: breast neoplasms; triple-negative breast neoplasms; liquid biopsy; biomarkers; extracellular vesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Origem e conteúdo molecular das vesículas extracelulares (VEs).	25
Figura 2 – Estrutura do nucleossomo e organização do dímero de histonas H2A-H2B.	26
Figura 3 – Estrutura tridimensional da proteína cistatina A (CSTA).	27
Figura 4 – Representação esquemática do isolamento de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).	33
Figura 5 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).	44
Figura 6 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).	45
Figura 7 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por Western blotting.	46
Figura 8 – Análise da concentração da proteína CSTA em vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por ensaio imunoenzimático (ELISA).	47
Figura 9 – Análise da concentração da proteína H2A em vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por ensaio imunoenzimático (ELISA).	49
Figura 10 – Controles positivo e negativo da marcação imuno-histoquímica citoplasmática para CSTA.	50
Figura 11 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário triplo-negativo.	51
Figura 12 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário luminal A.	52
Figura 13 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário luminal B.	53
Figura 14 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário HER2+.	53
Figura 15 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido mamário com lesões benignas.	54
Figura 16 – Análise quantitativa da detecção citoplasmática de CSTA por imuno-histoquímica pelo HistoScore (H-score).	55
Figura 17 – Controles positivo e negativo da marcação imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática para H2A.	56

Figura 18 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário triplo-negativo.	57
Figura 19 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário luminal A.	58
Figura 20 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário luminal B.	59
Figura 21 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário HER2+.	59
Figura 22 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido mamário com lesões benignas.	60
Figura 23 – Análise quantitativa da detecção nuclear de H2A por imuno-histoquímica pelo Histoscore (H-score).	61
Figura 24 – Análise quantitativa da detecção citoplasmática de H2A por imuno-histoquímica pelo Histoscore (H-score).	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Classificação molecular do câncer de mama.	22
Quadro 2 – Estadiamento tumoral do câncer de mama baseado no sistema TNM.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos <i>pools</i> de amostras de acordo com o diagnóstico, identificação das pacientes, idade e estadiamento clínico-patológico.....	39
Tabela 2 – Características demográficas e clínicas das participantes incluídas no estudo.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CEP-FAMERP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CM	Câncer de mama
CMTN	Câncer de mama triplo-negativo
CSTA	Cistatina A
CTCs	Células tumorais circulantes
ctDNA	DNA tumoral circulante
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
H2A	Histona H2A
HER2	Fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
H-score	Histoscore
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
PARP	Inibidores de poli(ADP-ribose) polimerase
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
UC	Ultracentrifugação
VEs	Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	CÂNCER DE MAMA: ASPECTOS GERAIS	21
1.2	CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO (CMTN).....	23
1.3	BIÓPSIA LÍQUIDA E BIOMARCADORES	24
1.4	PROTEÍNAS HISTONA H2A E CISTATINA A	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL.....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	METODOLOGIA.....	30
3.1	ASPECTOS ÉTICOS	30
3.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA	30
3.3	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	31
3.4	ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS	31
3.5	<i>POOL</i> DE AMOSTRAS.....	31
3.6	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES).....	32
3.6.1	Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)	32
3.6.2	Ultracentrifugação (UC)	34
3.6.3	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	34
3.6.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	34
3.6.5	Western blotting	34
3.7	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS	35
3.7.1	Ensaio Imunoenzimático do tipo sanduíche (ELISA)	35
3.7.2	Imuno-histoquímica.....	36
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	SELEÇÃO DE PACIENTES E DEFINIÇÃO DOS <i>POOLS</i> DE AMOSTRAS	38
4.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES).....	41
4.3	ANÁLISE DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	46
4.4	ANÁLISE DE MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	50
5	DISCUSSÃO	63

CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	77
APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E EPIDEMIOLÓGICA DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO ESTUDO	81
ANEXO A – PARECER FAVORÁVEL DO COMITÊ DE ÉTICA	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA: ASPECTOS GERAIS

O câncer de mama (CM) é a forma de câncer mais prevalente e letal entre as mulheres, com estimativas mundiais de mais de 2,2 milhões de novos casos e mais de 660 mil mortes no ano de 2022, além de ser o tipo de câncer mais diagnosticado em 158 países e o principal responsável por mortes em 111 países. No Brasil, não considerando os tumores de pele não melanoma, o CM é o tipo de câncer mais comum e letal em mulheres, responsável por mais de 94 mil casos e mais de 22 mil mortes no ano de 2022, e com estimativas de mais de 220 mil novos casos para o período de 2023 a 2025 (Ferlay *et al.*, 2024; INCA, 2024).

O desenvolvimento do CM começa quando as células do tecido mamário apresentam um comportamento anômalo, crescendo e proliferando rapidamente e de forma desordenada (ACS, 2025; NBCF, 2024). Vários fatores influenciam o início e a progressão da doença, podendo ser modificáveis ou não. Dentre os fatores modificáveis, relacionados ao estilo de vida, pode-se citar etilismo, tabagismo, sobrepeso ou obesidade principalmente no período pós-menopausa, sedentarismo e o uso de hormônios, especialmente como método de reposição hormonal na menopausa. Os fatores que não podem ser modificados são idade acima dos 50 anos, histórico familiar de CM e outros tipos de cânceres, alta densidade mamária, mutações genéticas, especialmente nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, menarca precoce (antes dos 12 anos) e menopausa tardia (após os 55 anos) (Fakhri *et al.*, 2022; Łukasiewicz *et al.*, 2021; Obeagu; Obeagu, 2024).

Considerado como um grupo diverso de doenças devido às diferentes características clínicas, morfológicas, genéticas e às respostas ao tratamento (INCA, 2022; Rakha *et al.*, 2022), o CM é classificado em subtipos histológicos e moleculares. Os subtipos histológicos são baseados no modo de crescimento anormal das células, sendo os mais comuns aqueles originados de células epiteliais que revestem os ductos e os lóbulos, conhecidos como carcinomas ductal e lobular, respectivamente. Esses carcinomas podem ser divididos em dois tipos principais: não invasivos (*in situ*), quando permanecem restritos ao local de origem, e invasivos, o tipo mais comum, caracterizados pela invasão do tecido mamário adjacente. Em estágios mais avançados, as células tumorais podem disseminar-se para linfonodos e órgãos distantes, originando metástases (Feng *et al.*, 2018; Rakha *et al.*, 2010).

A classificação molecular do CM baseia-se nas expressões dos receptores hormonais, de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), do fator de crescimento epidérmico

humano tipo 2 (HER2) e do marcador de proliferação celular Ki-67 (Sarhangi *et al.*, 2022; Tsang; Tse, 2019). Os subtipos moleculares são denominados: luminal A, luminal B, HER2+ e triplo-negativo, e as respectivas características de seus marcadores prognósticos estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação molecular do câncer de mama.

SUBTIPO MOLECULAR	MARCADORES
Luminal A	RE+, RP+, HER2-, Ki-67 baixo
Luminal B	RE+, RP+, HER2-, Ki-67 alto ou RE+, RP+/-, HER2+, Ki-67 baixo/alto
HER2+	RE-, RP-, HER2+, Ki-67 alto
Triplo-negativo	RE-, RP-, HER2-, Ki-67 alto

Fonte: Adaptado de Sarhangi *et al.* (2022) e Tsang; Tse (2019).

Além das características histológicas e moleculares, a avaliação do estadiamento clínico é essencial para compreender a extensão da doença e o planejamento do tratamento (Cserni *et al.*, 2018; Feng *et al.*, 2018). A definição do estadiamento baseia-se no sistema TNM, desenvolvido pelo Comitê Conjunto Americano sobre Câncer e pela União Internacional para o Controle do Câncer, os quais classificam o tumor considerando o tamanho e a extensão do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos regionais (N) e a presença de metástases à distância (M). A combinação desses parâmetros permite classificar a doença em diferentes estágios clínicos (0 a IV), orientando o prognóstico e a definição da conduta terapêutica (Quadro 2).

Quadro 2 – Estadiamento tumoral do câncer de mama baseado no sistema TNM.

ESTÁGIOS	SISTEMA TNM		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de AJCC (2010) e Tsang; Tse (2019).

1.2 CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO (CMTN)

O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) representa entre 15% e 20% dos casos de câncer de mama e ocorre tipicamente em mulheres mais jovens (frequentemente abaixo dos 40 anos) (Yin *et al.*, 2020). O CMTN pode ainda ser subdividido em *basal-like 1*, *basal-like 2*, mesenquimal, tronco-mesenquimal, imunomodulador e receptor de andrógeno luminal, mas, em um geral, apresenta um perfil de desenvolvimento biologicamente mais agressivo, com maior taxa de proliferação celular e maior probabilidade de desenvolvimento de metástases precoces, além de estar frequentemente associado a alterações no gene *BRCA1*, o que pode contribuir para sua instabilidade genômica e comportamento tumoral agressivo (Chen *et al.*, 2018; Lehmann *et al.*, 2011; Sporikova *et al.*, 2018).

Devido à ausência de receptores hormonais e de HER2, terapias-alvo amplamente utilizadas em outros subtipos de câncer de mama não são eficazes nesse contexto, o que limita as opções terapêuticas disponíveis (Bao *et al.*, 2019; Denkert *et al.*, 2017; Lehmann, Pietersen, 2013). Assim, a quimioterapia neoadjuvante (antes da cirurgia) é frequentemente utilizada

como principal abordagem terapêutica, podendo ser complementada pela cirurgia e pela radioterapia pós-cirúrgica (Denkert *et al.*, 2017; Tarighati *et al.*, 2022).

Mais recentemente, estratégias terapêuticas como imunoterapia e inibidores de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) têm sido investigadas como alternativas promissoras para pacientes com CMTN, especialmente em casos associados a mutações em genes de reparo do DNA (Sporikova *et al.*, 2018; Tarighati *et al.*, 2022). Apesar de algumas respostas positivas observadas em casos isolados, pacientes com CMTN enfrentam maior risco de recorrência da doença e desenvolvimento de metástases, resultando em menor sobrevida global e prognóstico geralmente desfavorável (Denkert *et al.*, 2017; Tarighati *et al.*, 2022).

1.3 BIÓPSIA LÍQUIDA E BIOMARCADORES

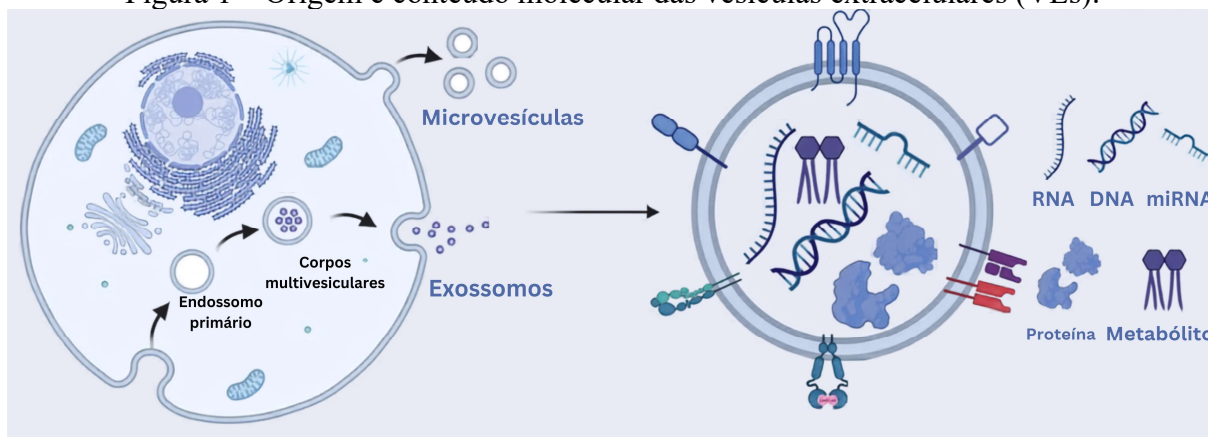
Considerando o prognóstico desfavorável do CMTN, torna-se evidente a necessidade de identificar biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce da doença. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, 2024), um biomarcador é definido como “uma molécula biológica detectável no sangue, e em outros fluidos corporais ou tecidos, que serve como sinal de um processo normal ou anormal, ou de uma condição ou doença”. Esses biomarcadores podem ser analisados por meio do procedimento de biópsia líquida, que consiste na coleta de fluidos biológicos para a análise de biomarcadores específicos relacionados ao câncer (Connal *et al.*, 2023; Lopes *et al.*, 2021).

A finalidade da biópsia líquida é detectar precocemente indícios de câncer, monitorar o avanço da doença e verificar a efetividade dos tratamentos (Liu; Jia; Zheng, 2024). Trata-se de uma abordagem menos invasiva, de menor risco e desconforto para os pacientes, permitindo a identificação de alterações moleculares por meio da análise de biomarcadores circulantes, que podem ser obtidos de maneira mais acessível quando comparados aos biomarcadores teciduais, extraídos por meio da biópsia de tecido, favorecendo coletas seriadas e o monitoramento dinâmico da doença ao longo do tempo (Diaz; Bardelli, 2014; Lopes *et al.*, 2021). Os biomarcadores liberados pelos tumores e analisados na biópsia líquida incluem células tumorais circulantes (CTCs), DNA tumoral circulante (ctDNA), vesículas extracelulares (VEs), RNAs não codificantes e proteínas (Alix-Panabières; Marchetti; Lang, 2023).

As VEs (Figura 1) são partículas de nano a microescala, delimitadas por uma bicamada lipídica, liberadas por todos os tipos de células (Welsh *et al.*, 2024). Essas partículas apresentam componentes como DNA, RNA, proteínas e lipídios, refletindo a composição da célula de origem. Com base em seu diâmetro e mecanismo de biogênese, podem ser

classificadas em três grupos: (i) exossomos, de 30 a 120 nm, originados de corpos multivesiculares; (ii) microvesículas, de 100 a 1000 nm, formadas diretamente pela brotação da membrana plasmática; e (iii) corpos apoptóticos, de 50 a 5000 nm, derivados de células em processo de morte celular (Abhange *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023; Théry *et al.*, 2018; Yaker *et al.*, 2020).

Figura 1 – Origem e conteúdo molecular das vesículas extracelulares (VEs).



Fonte: Adaptado de Ma *et al.* (2024).

Legenda: Representação esquemática da formação de vesículas extracelulares (VEs) e de seus conteúdos moleculares, incluindo RNA, DNA, miRNA, proteínas e metabólitos, que podem refletir características das células de origem.

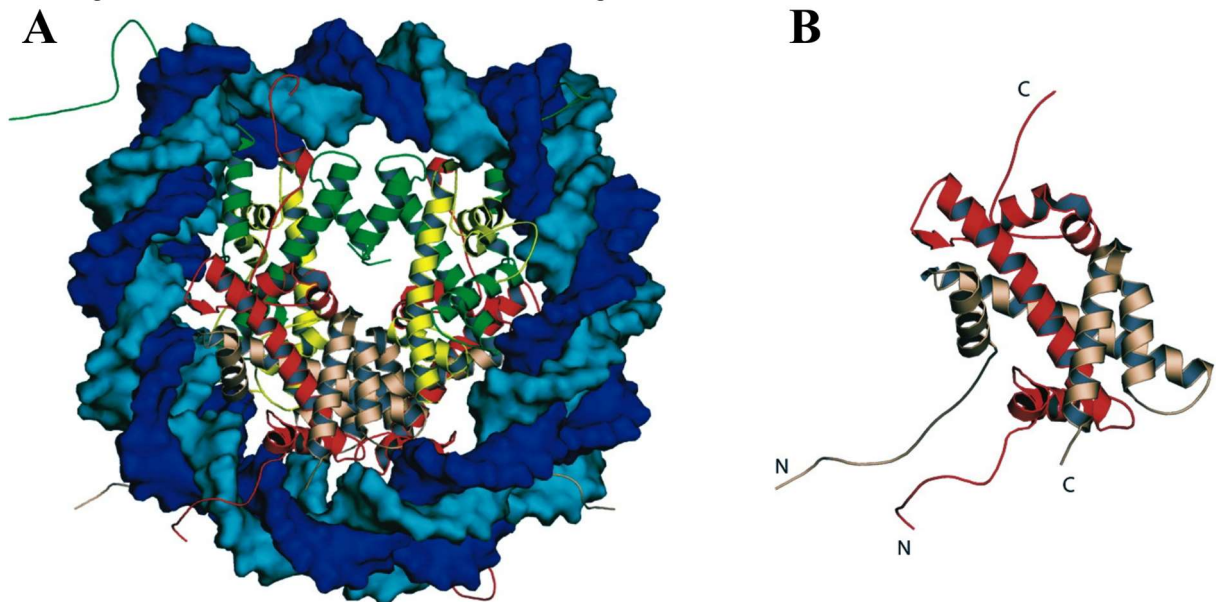
As VEs podem ser encontradas em grande quantidade nos fluidos biológicos e, por possuírem componentes provenientes da célula de origem, inclusive de células tumorais, contêm informações acerca da doença, sendo assim, consideradas potenciais biomarcadores de câncer detectáveis através de biópsia líquida (Dobra *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2023). Estudos como Ortega *et al.* (2020) e Vinik *et al.* (2020) demonstram o potencial de VEs provenientes do plasma como biomarcadores do câncer de mama que podem auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença.

1.4 PROTEÍNAS HISTONA H2A E CISTATINA A

Em estudo prévio, análises proteômicas em amostras de VEs plasmáticas de pacientes com CMTN identificaram proteínas associadas ao câncer, com destaque para a histona H2A (H2A) e a cistatina A (CSTA) (Tamarindo *et al.*, 2025). Esses achados sugerem a necessidade de maior investigação sobre seus papéis e potenciais aplicações como biomarcadores para o CMTN.

As histonas (Figura 2) são as principais proteínas que compõem a cromatina, sendo a sua unidade fundamental o nucleossomo, formado por um octâmero de histonas composto por duas cópias das proteínas histonas H2A, H2B, H3 e H4, ao redor do qual o DNA se enrola e é compactado (Füllgrabe; Hajji; Joseph, 2010; Kornberg; Lorch, 1999; Kouzarides, 2007; Yin *et al.*, 2024). A H2A desempenha funções importantes no nucleossomo: além de contribuir para a estabilização do octâmero de histonas e do DNA enrolado ao seu redor, também participa da formação da superfície do nucleossomo, mediando as interações envolvidas na compactação do DNA e fornecendo um ponto de ancoragem para enzimas (Jiang; Sobolvea; Tremethick, 2020).

Figura 2 – Estrutura do nucleossomo e organização do dímero de histonas H2A-H2B.



Fonte: Adaptado de Khorasanizadeh (2004).

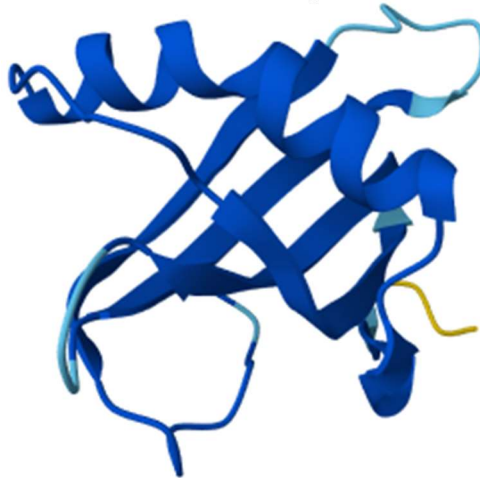
Legenda: (A) Representação estrutural do nucleossomo, constituído pelo DNA em tons de azul enrolado ao redor de um octâmero de histonas. (B) Representação estrutural do dímero de histonas H2A-H2B, formado pela associação entre as histonas H2A (vermelho) e H2B (rosa).

Além dessa função estrutural na compactação do DNA, as histonas desempenham papéis cruciais na regulação da expressão gênica e no reparo do DNA, por meio de modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação e fosforilação, bem como pela incorporação de suas variantes (Kouzarides, 2007; Yin *et al.*, 2024). A H2A apresenta o maior número de variantes já identificadas, as quais podem influenciar o início e a progressão de doenças, principalmente no desenvolvimento tumoral, por meio da regulação da transcrição gênica e da resposta a danos no DNA. Entre as principais variantes destacam-se H2A.Z, frequentemente associada a processos pró-oncogênicos em diferentes tipos de câncer, H2A.X, relacionada a mecanismos de resposta a danos no DNA e com possíveis características

supressoras tumorais, e macroH2A, que pode apresentar funções tanto oncogênicas quanto supressoras tumorais dependendo do contexto celular (Jiang; Sobolva; Tremethick, 2020; Yin *et al.*, 2024). Essa ligação com a biologia tumoral permite que essa proteína emergja como um potencial biomarcador no câncer, fornecendo informações importantes para diagnóstico e prognóstico da doença (Lai; Chan, 2024; Vardabasso *et al.*, 2013).

A cistatina A (CSTA) (Figura 3), também conhecida como estefina A, é uma proteína intracelular pertencente à superfamília das cistatinas, composta por cerca de 98 aminoácidos e com peso molecular de aproximadamente 11 kDa, sendo expressa predominantemente em células mioepiteliais. Sua principal função é a inibição da atividade das proteases cisteínicas, como as catepsinas B, H, L e S, enzimas envolvidas em processos associados ao desenvolvimento, progressão e sobrevivência tumoral (John Mary *et al.*, 2020; Kuopio *et al.*, 1998). Essa função inibitória é importante para a regulação da atividade proteolítica nas células, protegendo contra a autólise e contribuindo para a manutenção da integridade celular (Turk; Stoka; Turk, 2008).

Figura 3 – Estrutura tridimensional da proteína cistatina A (CSTA).



Fonte: AlphaFold Protein Structure Database (2026).

Legenda: Representação da estrutura tridimensional da proteína cistatina A (CSTA).

Diversos estudos demonstram que a CSTA também tem sido investigada em outros tipos de neoplasias, como os cânceres de pulmão, esôfago, e pâncreas (Butler *et al.*, 2011; Komura *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2017; Nasti *et al.*, 2025; Shiba *et al.*, 2018), indicando que essa proteína pode desempenhar diferentes funções no contexto tumoral, atuando como moduladora de processos tumorais ou como marcador prognóstico. No contexto do câncer de mama, diversos estudos também investigam o papel da CSTA, como os realizados por Kuopio *et al.* (1998), que demonstraram associação entre a expressão de CSTA e um fenótipo tumoral mais

agressivo, e por Levičar *et al.* (2002), que observaram níveis elevados de CSTA no citosol de tumores mamários invasivos primários. Parker *et al.* (2007) demonstraram correlação entre a expressão da proteína e a sobrevida livre da doença, bem como redução do risco de metástase. Por sua vez, Lah *et al.* (1992) identificaram níveis mais baixos de mRNA e de proteína CSTA em carcinomas mamários.

De modo geral, a relação entre a expressão da CSTA e o prognóstico do câncer de mama, bem como seu papel específico nos tumores mamários, ainda não está completamente esclarecida, apresentando resultados divergentes na literatura (Duivenvoorden *et al.*, 2017; John Mary *et al.*, 2020).

Embora estudos prévios tenham identificado as proteínas H2A e CSTA em VEs do soro de pacientes com CMTN, ainda são necessárias a investigação e a validação da presença dessas proteínas em diferentes contextos do câncer de mama. A investigação conjunta em VEs e tecido tumoral pode, portanto, contribuir para avaliar o potencial dessas proteínas como biomarcadores do CMTN e ampliar a compreensão de sua relevância no contexto tumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial das proteínas histona H2A (H2A) e cistatina A (CSTA) como biomarcadores do câncer de mama triplo-negativo (CMTN), por meio da análise em biópsia líquida e em tecido tumoral por imuno-histoquímica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar o perfil clínico, demográfico e histopatológico das pacientes incluídas no estudo, por meio da análise dos prontuários e dados clínicos coletados;
2. Isolar e caracterizar as vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas de pacientes com tumores mamários malignos, lesões benignas e mulheres saudáveis, utilizando cromatografia por exclusão de tamanho (*size exclusion chromatography*, SEC), ultracentrifugação (UC), análise de rastreamento de nanopartículas (*nanoparticle tracking analysis*, NTA), microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*, TEM);
3. Quantificar as proteínas H2A e CSTA por meio de ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) utilizando VEs plasmáticas;
4. Avaliar a expressão das proteínas H2A e CSTA em amostras de tecido tumoral por meio de imuno-histoquímica;
5. Avaliar o potencial das proteínas H2A e CSTA como biomarcadores do CMTN, considerando sua aplicabilidade na biópsia líquida e no tecido tumoral.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo está em conformidade com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 466/12; Brasil, 2012) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEP-FAMERP), sob o parecer nº 7.102.646 e CAAE nº 82558524.2.0000.5415 (Anexo A).

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população do estudo foi composta por 159 participantes, incluindo pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Hospital de Base de São José do Rio Preto com suspeita clínica, mamográfica ou ultrassonográfica de câncer de mama, encaminhados para investigação diagnóstica e realização de *core biopsy* no período entre outubro de 2024 e julho de 2025, e indivíduos saudáveis.

Foram elegíveis pacientes do sexo feminino, com idade igual ou superior a 18 anos, atendidas pelo SUS, em investigação para diagnóstico de câncer de mama ou recém-diagnosticadas, desde que não tivessem realizado qualquer tipo de tratamento cirúrgico, quimioterápico, radioterápico ou hormonal antes da coleta, não apresentassem histórico de outros tipos de câncer e assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Para o grupo controle, foram elegíveis participantes do sexo feminino, com idade igual ou superior a 18 anos, que não apresentassem qualquer tipo de lesão mamária nem histórico de outros tipos de câncer.

Os critérios de exclusão abrangeram pacientes do sexo feminino com idade inferior a 18 anos, pacientes do sexo masculino, pacientes não atendidas pelo SUS, pacientes que já tivessem realizado qualquer tipo de tratamento cirúrgico, quimioterápico, radioterápico ou hormonal antes da coleta, pacientes com histórico de outros tipos de câncer, e pacientes grávidas ou lactantes. Também foram excluídas pacientes com prontuário incompleto para informações essenciais, como idade, diagnóstico e tipo histológico, que não tivessem realizado o procedimento de *core biopsy* no dia da coleta, e aquelas com presença de mais de um subtipo de câncer de mama.

3.3 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de coleta contendo anticoagulante (EDTA), homogeneizadas suavemente e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, para separação do plasma. O plasma obtido foi aliquotado em microtubos, identificados e armazenados a -80 °C.

As amostras de tecido tumoral mamário, obtidas por meio de *core biopsy*, foram coletadas pela equipe médica do setor de Mamografia do Hospital de Base. Posteriormente, foram processadas e incluídas em blocos de parafina no setor de Patologia e disponibilizadas para análises imuno-histoquímicas subsequentes.

3.4 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS

Os prontuários das pacientes foram consultados por meio do sistema eletrônico MVPEP do Hospital de Base. As informações coletadas abrangeram dados clínicos e histopatológicos relevantes para a caracterização da amostra e posterior análise dos dados, como idade, diagnóstico, estadiamento da doença, tipo histológico do tumor, tamanho tumoral, presença de metástases e hábitos de vida como etilismo, tabagismo, além de dados relacionados ao sobrepeso e à obesidade.

3.5 POOL DE AMOSTRAS

Considerando o elevado número de amostras obtidas no estudo e as limitações relacionadas ao tempo e aos recursos disponíveis, optou-se pela estratégia de *pooling* de amostras com o objetivo de otimizar as análises e os processos experimentais, reduzir os custos operacionais e viabilizar a execução do estudo nas condições disponíveis.

Para a análise das proteínas candidatas, as amostras de cada grupo diagnóstico foram organizadas de acordo com critérios específicos para cada grupo. Para o grupo Controle (C), as pacientes foram agrupadas considerando exclusivamente a faixa etária, distribuindo-as em ordem crescente de idade em quatro *pools*. No grupo Benigno (B), como havia uma predominância de diagnósticos de fibroadenoma e fibroesclerose estromal, foram formados dois *pools* de cada subtipo. Além disso, as pacientes foram selecionadas de acordo com a idade e a quantidade de amostra obtida pela *core biopsy*. Para todos os grupos de câncer de mama, a estratégia baseou-se no estadiamento clínico-patológico de acordo com os parâmetros do

sistema TNM, agrupando inicialmente as pacientes que apresentavam metástase à distância ($M = 1$), seguido do agrupamento das pacientes com linfonodos comprometidos ($N \geq 1$) e, por fim, das pacientes que não apresentavam metástase ou linfonodos comprometidos ($M = 0$ e $N = 0$), que foram agrupadas conforme a extensão do tumor primário (T1, T2, T3 e T4). Cada *pool* foi formado por no mínimo duas amostras e os agrupamentos foram ajustados de acordo com o número de pacientes em cada categoria (T, N e M).

3.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

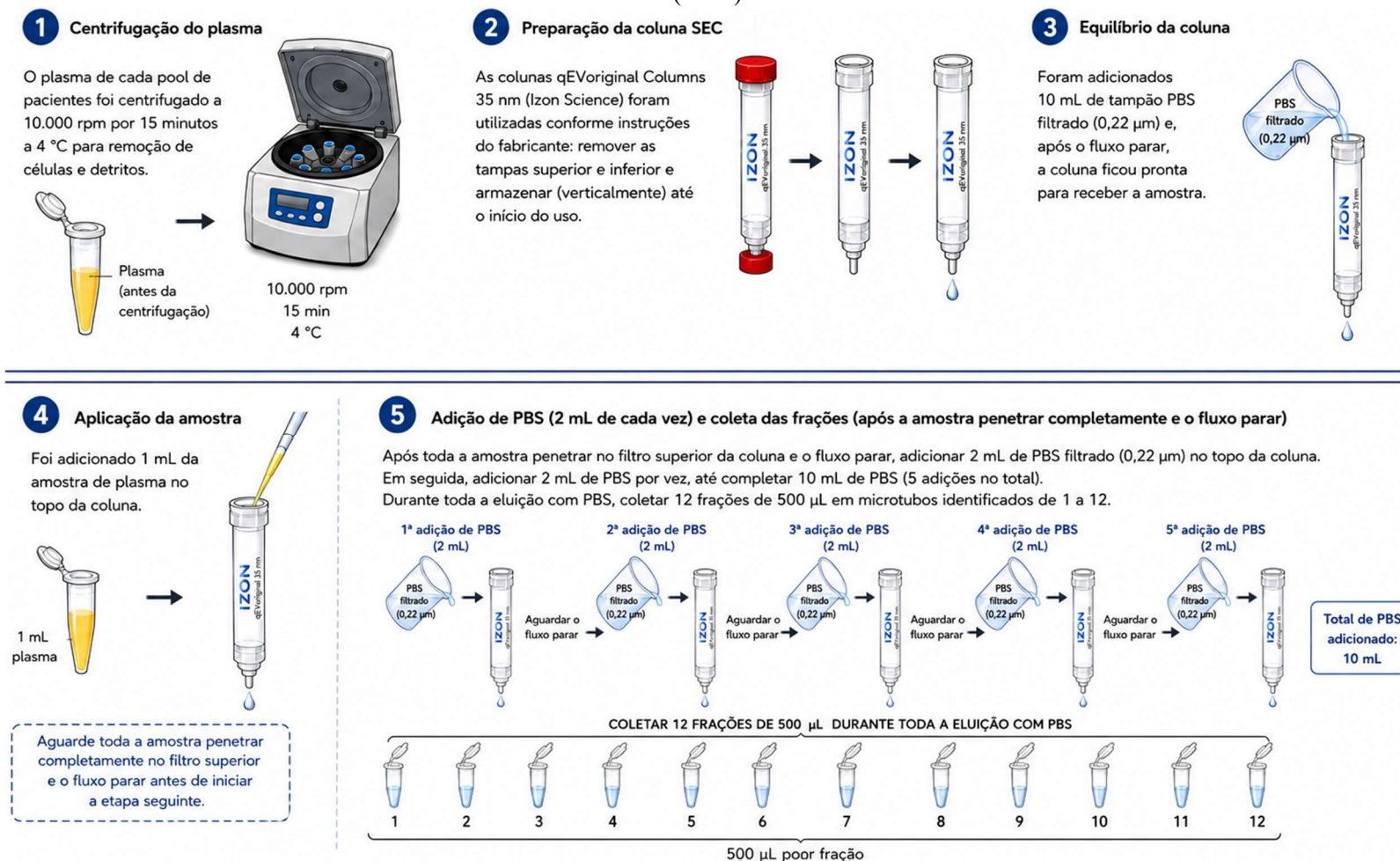
As etapas de isolamento e caracterização das VEs foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Glicobioquímica e Doenças Infecciosas e o Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica, ambos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP), e o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Amor de Barretos.

3.6.1 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)

As VEs foram isoladas primeiramente por meio da cromatografia por exclusão de tamanho (*size exclusion chromatography*, SEC) segundo Gaspar *et al.* (2020), com modificações (Figura 4). O plasma de cada *pool* de pacientes foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C para remoção de células e detritos. As colunas qEVoriginal Columns 35 nm (Izon Science) foram colocadas em um suporte próprio para que o tampão de armazenamento começasse a fluir pelas colunas. Foram adicionados 10 mL de tampão PBS filtrado (0,22 µm) e, após a interrupção do fluxo, foi adicionado 1 mL da amostra de plasma, iniciando-se a coleta de 12 frações de 500 µL em microtubos identificados de 1 a 12.

Após toda a amostra penetrar no filtro superior e o fluxo ser interrompido, foram adicionados inicialmente 2 mL de PBS filtrado (0,22 µm) e o volume foi completado até atingir 10 mL de PBS, enquanto eram coletadas as 12 frações. As frações de interesse, de 7 a 12 (cerca de 3 mL), foram armazenadas a -80 °C até a utilização na etapa seguinte, e as demais foram descartadas. Após a eluição com 10 mL de PBS, as colunas foram limpas conforme descrito pelo fabricante Izon Science, adicionando-se 8,5 mL de 0,5 M NaOH e 17 mL de PBS. Cada coluna foi utilizada até quatro vezes.

Figura 4 – Representação esquemática do isolamento de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).



Fonte: Elaborada pela autora com auxílio da ferramenta ChatGPT (OpenAI, versão GPT-5.5, acesso em 16 de maio de 2026, disponível em: <https://chatgpt.com/>), a partir de descrição textual do protocolo experimental utilizado neste estudo.

Legenda: Representação esquemática do isolamento das VEs plasmáticas por SEC utilizando colunas qEV original 35 nm (Izon Science). Após centrifugação inicial do plasma para remoção de células e detritos celulares, foram coletadas 12 frações de 500 µL, das quais as frações 7 a 12 foram destinadas às análises subsequentes.

3.6.2 Ultracentrifugação (UC)

As frações de interesse de um mesmo *pool* foram descongeladas, combinadas em um único tubo e ultracentrifugadas a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4 °C (Ultracentrífuga Optima TLX, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). O pellet resultante foi ressuspenso em 1 mL de PBS.

3.6.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A análise da distribuição do tamanho e da concentração das VEs foi realizada no equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) equipado com software de captura rápida de vídeo e rastreamento de partículas. As vesículas isoladas foram diluídas em PBS filtrado (0,22 µm) na proporção de 1:1000 e injetadas no aparelho para análise. As medições foram obtidas utilizando-se o software NanoSight NS300 (versão 3.4.4) a partir de três vídeos de 60 segundos cada.

3.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As amostras de VEs foram incubadas com glutaraldeído a 2% e paraformaldeído a 2%, em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio (pH 7,4) por 4 horas entre 2 e 4 °C, e posteriormente ultracentrifugadas a $100.000 \times g$ por 1 hora a 4 °C (Ultracentrífuga Optima TLX, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). O *pellet* obtido foi ressuspenso em 200 µL de tampão de cacodilato de sódio. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio JEOL JEM-1400 Flash (Programa de Equipamentos Multiusuários FAPESP EMU– Processo nº 22/11494-3).

3.6.5 Western blotting

As VEs plasmáticas, anteriormente separadas em *pools*, foram agrupadas em uma única amostra por grupo. As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra 4x Laemmli (Bio-Rad, #1610747) na proporção de 3:1 (v/v), aquecidas a 100 °C por 5 minutos e submetidas a um breve *spin*. Em seguida, 50 µL de cada amostra foram aplicados em gel de SDS-PAGE a 10% (TGX FastCast Acrylamide Kit, Bio-Rad, #1610173) no sistema Mini-Protean (Bio-Rad) a 120 V por cerca de 60 minutos.

A transferência para membrana de nitrocelulose foi realizada no sistema semi-seco TE 70 PWR (Amersham Biosciences), a 60 mA por 90 minutos, sendo sua eficiência verificada por coloração com Ponceau S durante 4 minutos. As membranas foram bloqueadas com BSA a 3% em TBST por 1 hora e incubadas *overnight* sob agitação a 4 °C com os anticorpos anti-CD63 (Ms, Abcam #193349) e anti-CD81 (Ms, Abcam #79559), ambos na diluição de 1:1000 em leite desnatado a 5% em TBST.

O complexo proteína-anticorpo foi incubado com o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado à HRP (Cell Signaling, #7076) na diluição de 1:10.000 por 1 hora, à temperatura ambiente. As membranas foram submetidas à decapagem (*stripping*) com Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, #21059) por 1 minuto, bloqueadas com leite a 5% por 3 horas e reincubadas com os anticorpos. A detecção foi realizada utilizando-se uma mistura dos reagentes ECL Western Blotting Substrate e SuperSignal West Atto Ultimate Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, #A38555), e os sinais foram detectados utilizando o equipamento ChemiDoc MP (Bio-Rad).

3.7 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS CANDIDATAS

3.7.1 Ensaio Imunoenzimático do tipo sanduíche (ELISA)

A quantificação das proteínas H2A e CSTA foi realizada por ELISA do tipo sanduíche utilizando os kits H2A (Histone H2A) e Human Cystatin A (ELK4989, ELK1934, ELK Biotechnology), conforme as instruções do fabricante. As VEs (1×10^{10} partículas/mL) foram lisadas em volume igual (150 µL) de tampão RIPA contendo 0,2% de inibidor de protease, aquecidas a 95 °C por 5 minutos e sonicadas por 1 minuto com amplitude de 30% e pulso de 5 segundos. Foram adicionados 100 µL da solução padrão e das amostras nos respectivos poços, e a placa foi incubada por 80 minutos a 37 °C. Em seguida, foram realizadas três lavagens com a solução própria. Foram adicionados 100 µL da solução de anticorpo biotinilado a cada poço, e a placa foi incubada por 50 minutos, a 37 °C. O conteúdo foi descartado, e o processo de lavagem foi repetido três vezes. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de estreptavidina-HRP a cada poço, e a placa foi novamente incubada por 50 minutos a 37 °C. Após essa etapa, foram realizados cinco ciclos de lavagem. Por fim, foram adicionados 90 µL da solução de substrato TMB a cada poço, e a placa foi coberta e incubada por cerca de 20 minutos a 37 °C. Com a adição de 50 µL da solução de parada, a reação foi interrompida e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

3.7.2 Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica foi utilizado o kit de detecção EnVision FLEX+ (Dako Agilent Technologies, Inc.). As amostras de tecido tumoral em blocos de parafina foram cortadas em micrótomo, em seções de 3-4 μm , preparadas em lâminas de vidro silanizadas e levadas à estufa por 3 horas. Após esse período, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, álcool absoluto, álcool 70% e álcool 50%. Em seguida, foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão citrato (pH 6,0) previamente aquecido, para recuperação antigênica em panela a vapor por 30 minutos, a 95 °C. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente para resfriar por 30 minutos e, em seguida, lavadas com *wash buffer* (5 min) e colocadas em câmara úmida.

As lâminas foram incubadas com solução de peróxido de hidrogênio por 15 minutos, seguidas de duas lavagens com *wash buffer* (2x5min). Em seguida, foi adicionada a solução de bloqueio de proteínas inespecíficas (BSA a 3% em PBS) e as lâminas foram incubadas por 10 minutos. O excesso da solução foi retirado e, sem lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpos anti-histona H2A (1:600, A3692, ABclonal) e anti-cistatina A (1:300, ab166805, Abcam) a 4 °C, *overnight*. As lâminas foram lavadas com *wash buffer* (3x5min) e incubadas com o marcador enzimático HRP por 15 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com *wash buffer* (3x5min) e, em ambiente escuro, o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) foi aplicado nas lâminas durante 2 minutos.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e, ainda em ambiente escuro, imersas por 2 minutos em hematoxilina de Harris e, posteriormente, lavadas em água destilada. Por fim, as lâminas passaram pelas etapas de desidratação em álcool 50%, álcool 70%, álcool absoluto e xilol e foram montadas para visualização. Os controles negativos de ambas as proteínas foram obtidos pela omissão dos anticorpos.

As imagens foram visualizadas e fotografadas com a objetiva de 40x no microscópio óptico BX 60 com a câmera DP71, utilizando o software DP-BSW V3.1 (Olympus, Japão). Foram analisados preferencialmente cinco campos representativos da área tumoral. Entretanto, como algumas amostras não apresentaram área tumoral suficiente para obtenção dos cinco campos, foi avaliada toda a área tumoral disponível.

As marcações foram quantificadas utilizando o software de análise de imagens ImageJ pelo método de HistoScore (H-score) (Jensen *et al.*, 2016; Varghese *et al.*, 2014), considerando a intensidade da marcação e a porcentagem de células marcadas. Em cada análise, foi calculado um valor de H-score de 0 a 300, de acordo com a seguinte fórmula: $\text{H-score} = (1$

x % de células com coloração fraca) + (2 x % de células com coloração moderada) + (3 x % de células com coloração forte).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 10.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A normalidade dos dados tanto na análise por ELISA quanto por imuno-histoquímica foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a análise dos dados obtidos por ELISA foi utilizado o teste de Two-way ANOVA, e para as comparações múltiplas direcionadas entre o grupo Triplo-negativo e os demais grupos, foi aplicado o teste de Dunnett. Para a análise dos dados obtidos por imuno-histoquímica, foram utilizados os testes de One-way ANOVA e Kruskal-Wallis, e para as comparações múltiplas direcionadas entre o grupo Triplo-negativo e os demais grupos, foram aplicados os testes de Dunnett e de Dunn. Foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) em todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES E DEFINIÇÃO DOS *POOLS* DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 159 participantes no período de outubro de 2024 a julho de 2025. Dentre essas, três apresentavam prontuário incompleto, sem informações sobre resultados de exames ou histórico médico; duas não realizaram o procedimento de *core biopsy* no dia da coleta; três apresentavam mais de um tipo de câncer de mama; e uma possuía histórico prévio de câncer registrado em seu prontuário, informação que não havia sido relatada no momento da coleta. Assim, nove participantes foram excluídas inicialmente, resultando em 150 participantes elegíveis. Dentre essas, 12 eram saudáveis (grupo Controle), 85 apresentavam lesões benignas e 53 apresentavam tumores malignos, dos quais 15 do subtipo luminal A, 19 luminal B, 6 HER2+ e 13 triplo-negativos. O Apêndice B apresenta os dados clínicos e histopatológicos relevantes das 150 participantes.

Como o objetivo central do estudo foi a investigação das proteínas H2A e CSTA no CMTN, o número de pacientes disponíveis nesse grupo (13) determinou o número máximo de amostras selecionadas para os demais grupos, a fim de manter a proporcionalidade e o equilíbrio nas análises. De acordo com os critérios previamente estabelecidos para a formação dos *pools*, as amostras do grupo Controle foram agrupadas conforme a faixa etária; as do grupo Benigno, de acordo com o diagnóstico histopatológico (fibroadenoma e fibroesclerose estromal); e as dos grupos dos tumores malignos, de acordo com o estadiamento clínico-patológico, segundo o sistema TNM. Ao todo, foram formados 21 *pools* de amostras (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos *pools* de amostras de acordo com o diagnóstico, identificação das pacientes, idade e estadiamento clínico-patológico.

DIAGNÓSTICO	POOL	ID	IDADE (ANOS)	ESTADIAMENTO
TRIPLO- NEGATIVO (n = 13)	T1	T1.1	47	cTis N0 M0
		T1.2	69	cT2 N0 M0
		T1.3	56	cT2 cN0 M0
	T2	T2.1	60	T3 N0 M0
		T2.2	48	cT3 N0 M0
		T2.3	33	cT4b N0 M0
	T3	T3.1	44	cT2 N1 M0
		T3.2	47	cT4b N1 M0
		T3.3	54	cT4d N2 M0
		T3.4	59	cT2 cN3 M0
	T4	T4.1	66	cT4d N1 M1
		T4.2	45	cT4b N2 M1
		T4.3	28	T4d N3 M1
LUMINAL A (n = 10)	LA1	LA1.1	54	T1c N0 M0
		LA1.2	55	T2 N0 M0
		LA1.3	47	T2 N0 M0
	LA2	LA2.1	55	T2 N0 M0
		LA2.2	44	T2 N0 M0
		LA2.3	62	T2 N0 M0
	LA3	LA3.1	51	T1c N1 M0
		LA3.2	60	cT2 N1 M0
		LA3.3	31	T2 N1 M0
		LA3.4	78	pT2 pN1a M0
LUMINAL B (n = 11)	LB1	LB1.1	57	cT1c N0 M0
		LB1.2	39	T2 N0 M0
		LB1.3	49	cT2c N0 M0
	LB2	LB2.1	77	cT2 N0 M0
		LB2.2	76	T2 N0 M0
		LB2.3	73	T2 N0 M0
	LB3	LB3.1	63	T2c N1 M0
		LB3.2	33	cT4b N1 M0
		LB3.3	44	cT4d cN1 M0
	LB4	LB4.1	50	T2 N0 M1
		LB4.2	75	T4b N1 M1
HER2+ (n = 6)	H1	H1.1	51	pTis
		H1.2	48	pTis
		H1.3	41	cT1a N0 M0
		H1.4	37	T2 N0 M0

	H2	H2.1	30	T4d N1 M0
		H2.2	58	cT4d N2 M0
BENIGNO (n = 12)	B1	B1.1	20	Fibroadenoma
		B1.2	23	
		B1.3	27	
	B2	B2.1	28	Fibroadenoma
		B2.2	32	
		B2.3	35	
	B3	B3.1	41	Fibroesclerose estromal
		B3.2	43	
		B3.3	47	
	B4	B4.1	51	Fibroesclerose estromal
		B4.2	53	
		B4.3	60	
CONTROLE (n = 12)	C1	C1.1	21	-
		C1.2	26	-
		C1.3	28	-
	C2	C2.1	32	-
		C2.2	30	-
		C2.3	32	-
	C3	C3.1	48	-
		C3.2	47	-
		C3.3	50	-
	C4	C4.1	59	-
		C4.2	63	-
		C4.3	60	-

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: TNM: sistema de estadiamento tumoral baseado nas características do tumor primário (T), no comprometimento de linfonodos regionais (N) e na presença de metástase à distância (M). Tis indica carcinoma *in situ* e T1–T4 correspondem ao aumento progressivo do tamanho ou à invasão tumoral; N0–N3 indicam ausência ou grau crescente de comprometimento linfonodal; M0 e M1 indicam ausência ou presença de metástase. As letras c e p indicam estadiamento clínico e patológico, respectivamente. As siglas T, LA, LB, H, B e C correspondem, respectivamente, aos *pools* dos grupos Triplo-negativo, Luminal A, Luminal B, HER2+, Benigno e Controle.

A análise dos prontuários das participantes da pesquisa permitiu a caracterização da amostra. A idade das pacientes variou de 20 a 78 anos, com média de $47,7 \pm 12,75$ anos. Em relação ao tipo histológico dos tumores das 40 pacientes com câncer de mama, observou-se predominância do carcinoma ductal invasivo (CDI), seguida do carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e do carcinoma lobular invasivo (CLI). Quanto aos fatores de risco, os mais frequentes foram sobrepeso e obesidade, seguidos do histórico familiar de câncer, tabagismo, menarca precoce, uso de hormônios e etilismo. A Tabela 2 apresenta a distribuição detalhada dessas variáveis na

população estudada. A idade foi apresentada como valores mínimo e máximo, média e desvio padrão, enquanto as demais variáveis foram apresentadas em número absoluto e porcentagem.

Tabela 2 – Características demográficas e clínicas das participantes incluídas no estudo.

CARACTERÍSTICA	DISTRIBUIÇÃO
Idade	20 – 78 anos (47,7 ± 12,75)
Tripla-negativo	28 – 69 anos 50,46 ± 11,91
Luminal A	31 – 78 anos 53,7 ± 12,31
Luminal B	33 – 77 anos 57,81 ± 15,97
HER2+	30 – 58 anos 44,16 ± 10,14
Benigno	20 – 60 anos 38,33 ± 12,81
Controle	21 – 60 anos 39,83 ± 13,92
Tipo histológico	
CDI	36 (90%)
CDIS	3 (7,5%)
CLI	1 (2,5%)
Fatores de risco	
Etilismo	5 (12,5%)
Tabagismo	16 (40%)
Sobrepeso/Obesidade	32 (80%)
Menarca precoce	7 (17,5%)
Uso de hormônios	6 (15%)
Histórico familiar	20 (50%)

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: A idade e os fatores de risco foram calculados em relação ao número total de participantes da pesquisa (n = 64), enquanto o tipo histológico refere-se exclusivamente às 40 participantes com câncer de mama. CDI: carcinoma ductal invasivo; CDIS: carcinoma ductal *in situ*; CLI: carcinoma lobular invasivo.

4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

As VEs foram isoladas a partir de *pools* de amostras de plasma coletadas de pacientes com tumores malignos, lesões benignas e indivíduos saudáveis, por meio de SEC associada à UC, a fim de obter maior grau de purificação das amostras. Em seguida, foram

avaliadas a concentração de VEs (VEs/mL) e a distribuição do tamanho (nm), ambas por NTA (Figura 5).

No grupo Triplo-negativo (Figura 5A), observou-se concentração média de $8,25 \times 10^{10}$ VEs/mL e tamanho médio de 141,1 nm. Os *pools* T1 e T2 apresentaram as maiores concentrações do grupo, com valores próximos de 1×10^{11} VEs/mL, enquanto o *pool* T4 apresentou a menor concentração média, de $5,22 \times 10^{10}$ VEs/mL. Em relação ao tamanho das partículas, os *pools* T1 e T4 exibiram os maiores valores médios, entre 157 e 159 nm, ao passo que T2 e T3 apresentaram tamanhos médios próximos de 120 nm.

O grupo Luminal A (Figura 5B) apresentou concentração média de $1,11 \times 10^{11}$ VEs/mL e tamanho médio de 138,9 nm. Entre os *pools*, LA2 apresentou a maior concentração, de $1,59 \times 10^{11}$ VEs/mL, seguida por LA3, com $9,64 \times 10^{10}$ VEs/mL, e LA1, com $7,85 \times 10^{10}$ VEs/mL. Quanto ao tamanho das VEs, LA3 apresentou o maior valor médio, em torno de 160 nm, enquanto o menor tamanho foi observado em LA2.

Para o grupo Luminal B (Figura 5C), a concentração média foi de $1,24 \times 10^{11}$ VEs/mL, com tamanho médio de 137,6 nm. O *pool* LB2 apresentou a maior concentração, de $2,03 \times 10^{11}$ VEs/mL, enquanto LB3 e LB4 apresentaram concentrações próximas de 1×10^{11} VEs/mL. Em relação ao tamanho, LB3 apresentou o maior valor médio, de cerca de 153 nm, enquanto LB4 apresentou o menor tamanho, próximo de 120 nm.

No grupo HER2+ (Figura 5D), foram observados concentração média de $1,23 \times 10^{11}$ VEs/mL e tamanho médio de 150,6 nm. Os dois *pools* apresentaram valores semelhantes tanto de concentração quanto de tamanho, variando entre $1,1 \times 10^{11}$ e $1,3 \times 10^{11}$ VEs/mL e entre 148 e 153 nm, respectivamente.

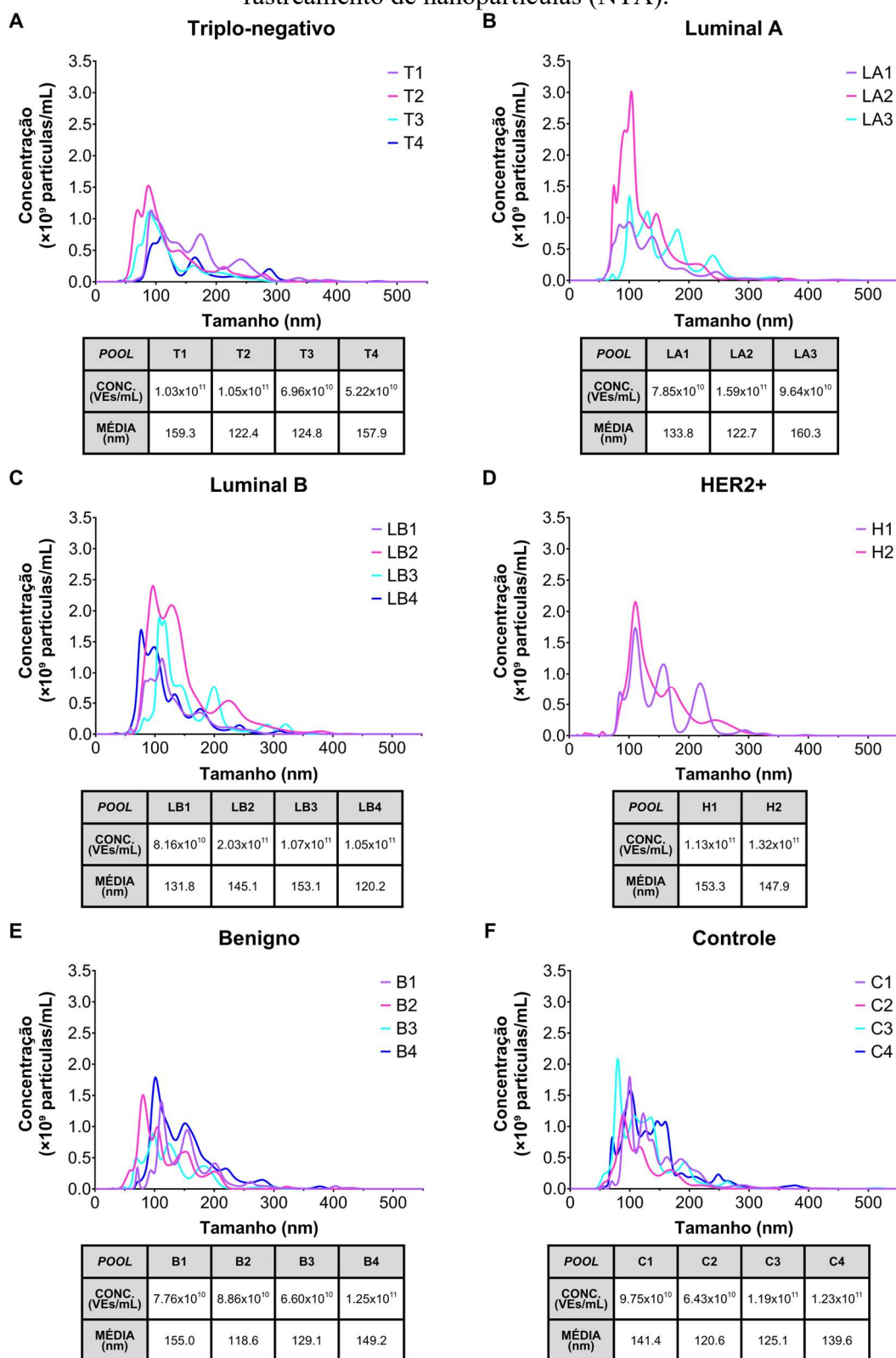
O grupo Benigno (Figura 5E) apresentou concentração média de $8,93 \times 10^{10}$ VEs/mL e tamanho médio de 138 nm. O *pool* B4 apresentou a maior concentração, de $1,25 \times 10^{11}$ VEs/mL, enquanto o *pool* B3 apresentou a menor, de $6,60 \times 10^{10}$ VEs/mL. Em relação ao tamanho das partículas, o maior valor foi observado em B1, de 155 nm, enquanto B2 apresentou o menor tamanho médio, aproximadamente de 118 nm.

Por fim, o grupo Controle (Figura 5F) apresentou concentração média de $1,01 \times 10^{11}$ VEs/mL e tamanho médio de 131,7 nm. Os *pools* C4 e C3 exibiram as maiores concentrações, em torno de $1,2 \times 10^{11}$ VEs/mL. Já os maiores tamanhos médios foram observados em C1 e C4, com valores próximos de 140 nm. O *pool* C2 apresentou os menores valores de concentração, $6,43 \times 10^{10}$ VEs/mL, e tamanho, cerca de 120 nm.

De maneira geral, observaram-se maiores concentrações de VEs nos grupos Luminal B e HER2+, enquanto os grupos Benigno e Triplo-negativo apresentaram as menores

concentrações. Além disso, os grupos Luminal B e Luminal A demonstraram maior variabilidade entre seus *pools*. Em relação ao tamanho das partículas, todos os grupos apresentaram médias semelhantes, variando aproximadamente entre 132 nm e 151 nm.

Figura 5 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).



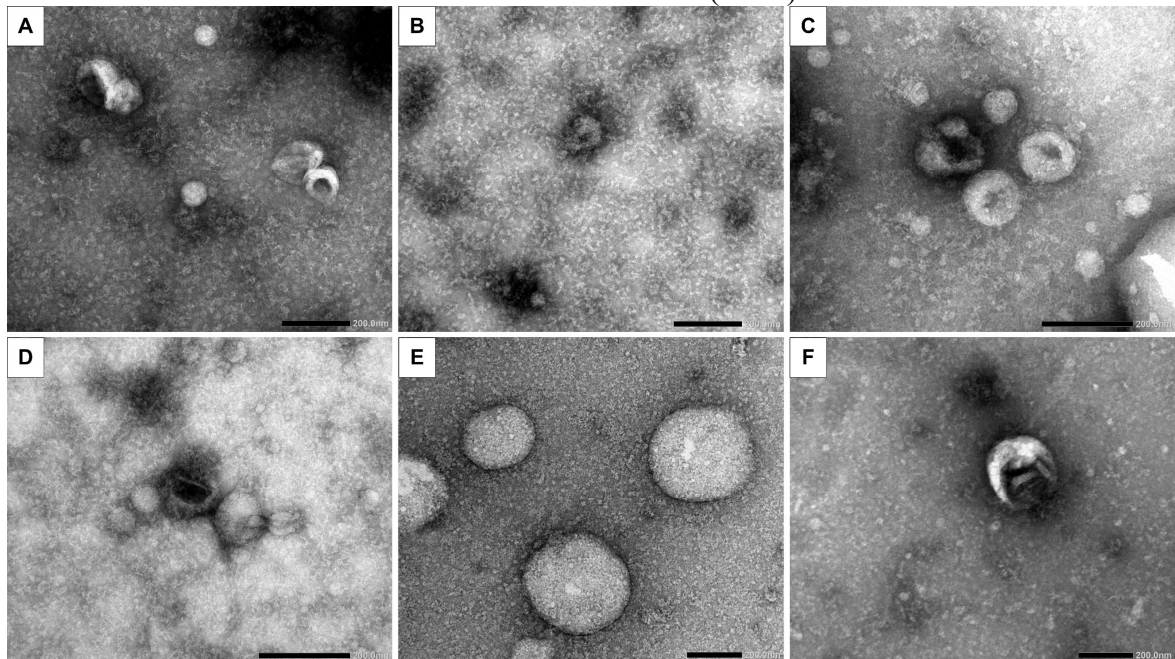
Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Os gráficos apresentam a distribuição do tamanho e da concentração das partículas obtidas dos grupos (A) Triplo-negativo, (B) Luminal A, (C) Luminal B, (D) HER2+, (E) Benigno e (F) Controle. As tabelas abaixo de cada gráfico apresentam a concentração de partículas (partículas/mL) e o diâmetro médio (nm) de cada pool de amostras. As análises foram realizadas no aparelho NanoSight NS300.

Por meio da microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi possível confirmar a presença de estruturas com morfologia compatível com a de VEs (Figura 6). No grupo Triplo-negativo (Figura 6A) destacaram-se vesículas com morfologia em formato de taça. O grupo Luminal A (Figura 6B) apresentou maior quantidade de agregados ao fundo, o que pode estar associado a uma maior heterogeneidade da amostra. O grupo Luminal B (Figura 6C) apresentou VEs com membranas definidas, morfologia mais arredondada e distribuição de forma mais homogênea. No grupo HER2+ (Figura 6D), as VEs mostraram-se mais agrupadas e com membranas sobrepostas. O grupo Benigno (Figura 6E) destacou-se pela presença de VEs com morfologia esférica e membranas bem delimitadas. Por fim, o grupo Controle (Figura 6F) apresentou VEs com morfologia mais irregular.

Em suma, as amostras dos *pools* de pacientes com câncer de mama, lesões benignas e indivíduos saudáveis apresentaram VEs com morfologia predominantemente esférica.

Figura 6 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).



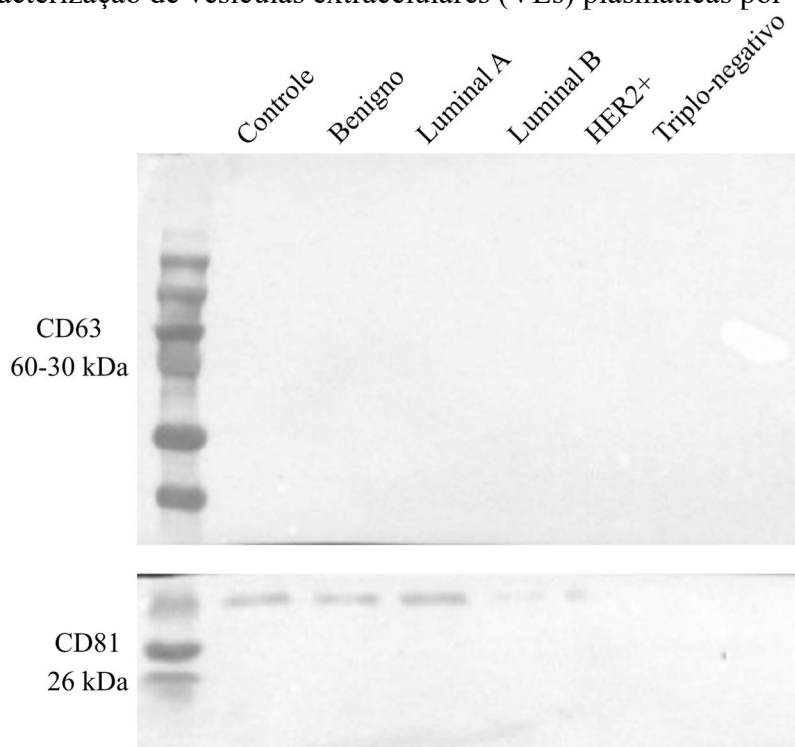
Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão de VEs extraídas do plasma sanguíneo de pacientes com lesões mamárias classificadas em (A) Triplo-negativo, (B) Luminal A, (C) Luminal B, (D) HER2+, (E) Benigno e (F) Indivíduos controle (saudáveis). Barra de escala: 200 nm.

A caracterização das VEs por Western blotting (Figura 7), utilizando os marcadores CD63 e CD81 recomendados para a caracterização das VEs, demonstrou expressão de CD81 nas amostras dos grupos Controle, Benigno, Luminal A e Luminal B, enquanto não foi

observada imunorreatividade nos grupos HER2+ e Triplo-negativo. O marcador CD63 não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

Figura 7 – Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por Western blotting.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

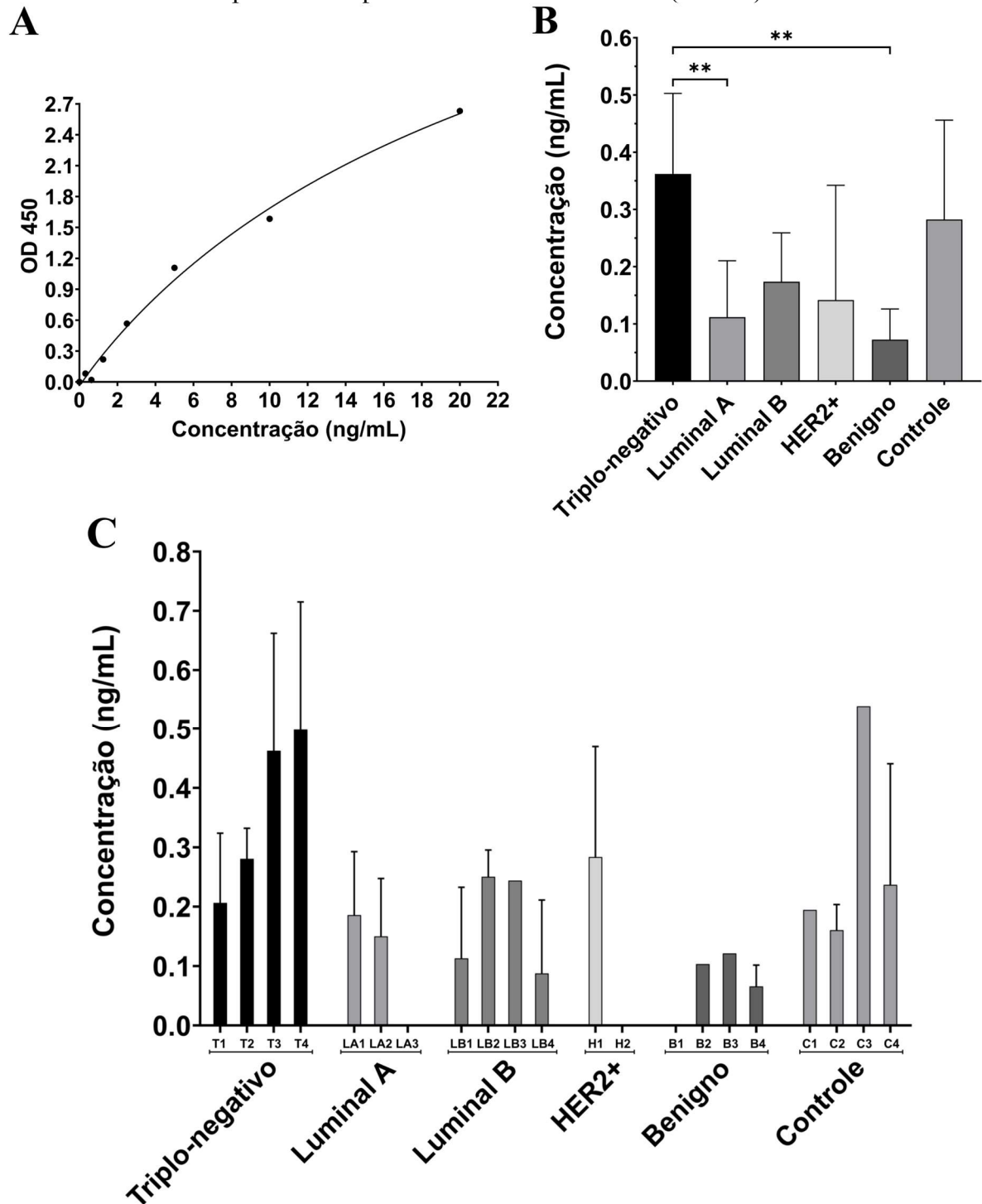
Legenda: Western blotting de VEs extraídas do plasma sanguíneo com anticorpo anti-CD63 apresentando ausência de sinal detectável em todos os grupos analisados, e com anticorpo anti-CD81 evidenciando bandas na massa molecular esperada de aproximadamente 26 kDa nos grupos Controle, Benigno, Luminal A e Luminal B, com ausência de sinal nos grupos HER2+ e Triplo-negativo.

4.3 ANÁLISE DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A concentração das proteínas CSTA e H2A nas VEs foi determinada por ELISA do tipo sanduíche, sendo cada *pool* analisado em triplicata e os resultados expressos como média das leituras. Para a proteína CSTA, a curva padrão (Figura 8A) apresentou bom ajuste ($R^2 = 0,9932$). Os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, permitindo a utilização do teste de Two-way ANOVA. A análise revelou efeito estatisticamente significativo para o fator correspondente aos grupos ($p = 0,0042$), mas não para o fator correspondente às réplicas experimentais ($p = 0,6350$). Em seguida, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunnett, utilizando o grupo Triplo-negativo como referência. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos Luminal A ($p = 0,0055$) e Benigno ($p = 0,0022$) (Figura 8B). A análise descritiva dos *pools* individualizados (Figura 8C) evidenciou variabilidade entre as amostras de cada grupo, sendo os grupos Luminal A e Benigno mais

homogêneos, enquanto os grupos Triplo-negativo e Controle apresentaram maior dispersão dos valores.

Figura 8 – Análise da concentração da proteína CSTA em vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por ensaio imunoenzimático (ELISA).

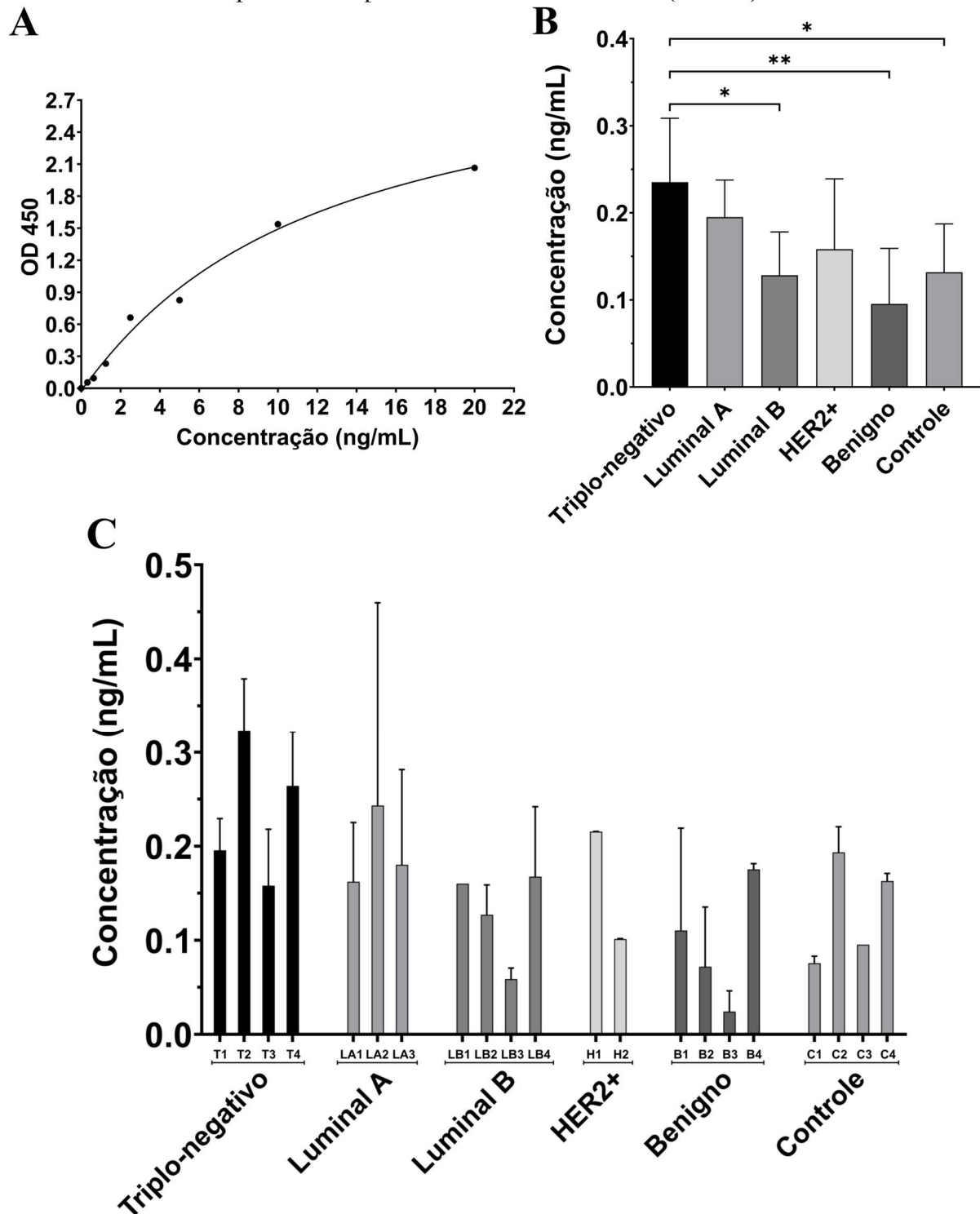


Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: (A) Curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de CSTA, utilizada para o cálculo das concentrações nas amostras de VEs plasmáticas. (B) Concentração média de CSTA (ng/mL) nas amostras de VEs plasmáticas. (C) Distribuição das concentrações de CSTA nos *pools* de cada grupo. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística: ** - $p < 0,01$.

Para a proteína H2A, a curva padrão (Figura 9A) apresentou bom ajuste ($R^2 = 0,9911$). Os dados apresentaram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk, permitindo a utilização do teste de Two-way ANOVA. A análise revelou efeito estatisticamente significativo tanto para o fator correspondente aos grupos ($p = 0,0037$) quanto para o fator correspondente às réplicas experimentais ($p = 0,0293$). Em seguida, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunnett, utilizando o grupo Triplo-negativo como referência. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos Luminal B ($p = 0,0186$), Benigno ($p = 0,0018$) e Controle ($p = 0,0280$) (Figura 9B). A análise descritiva dos *pools* individualizados (Figura 9C) evidenciou a variabilidade entre as amostras de cada grupo, sem um padrão consistente de distribuição.

Figura 9 – Análise da concentração da proteína H2A em vesículas extracelulares (VEs) plasmáticas por ensaio imunoenzimático (ELISA).



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

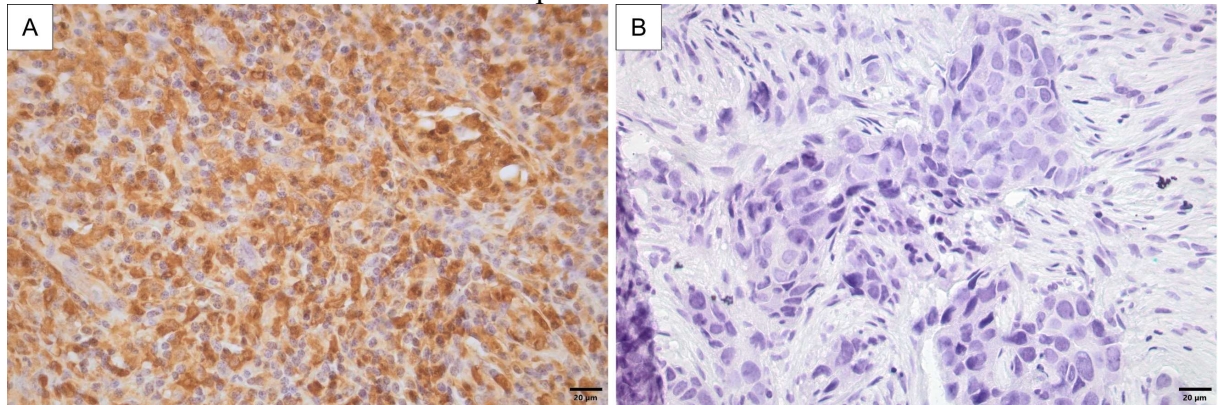
Legenda: (A) Curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de H2A, utilizada para o cálculo das concentrações nas amostras de VEs plasmáticas. (B) Concentração média de H2A (ng/mL) nas amostras de VEs plasmáticas. (C) Distribuição das concentrações de H2A nos *pools* de cada grupo. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

4.4 ANÁLISE DE MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

As amostras analisadas foram obtidas pela *core biopsy*, técnica que fornece quantidade limitada de tecido tumoral, o que pode reduzir a área disponível para análise imuno-histoquímica. Assim, algumas amostras não apresentaram área tumoral suficiente para obtenção dos cinco campos necessários para a análise e para o cálculo do H-score. Nesses casos, foram analisadas todas as áreas tumorais disponíveis.

Para a proteína CSTA, os controles positivo e negativo da marcação imuno-histoquímica estão representados na Figura 10. A marcação foi visualizada pela coloração marrom no citoplasma das células, indicada pelas setas pretas nas Figuras 11 a 15. Observou-se padrão de marcação citoplasmática tanto nos tumores malignos quanto nas lesões benignas. No entanto, as marcações mais intensas foram observadas no grupo Triplo-negativo (Figura 11), que também apresentou padrão heterogêneo entre os *pools* analisados. Nos grupos Luminal A e Luminal B (Figuras 12 e 13) não foram observadas marcações citoplasmáticas nas amostras. Já nos grupos HER2+ (Figura 14) e Benigno (Figura 15), foram observadas marcações citoplasmáticas de baixa intensidade.

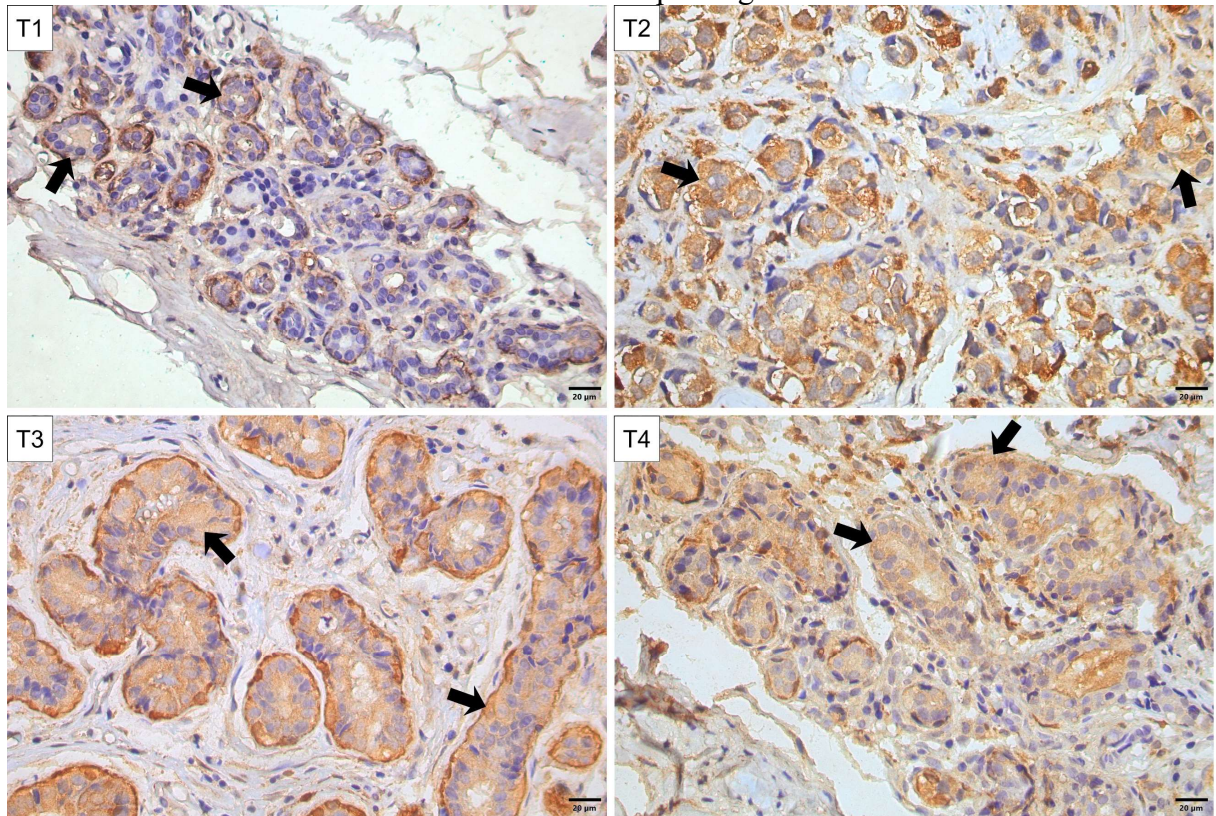
Figura 10 – Controles positivo e negativo da marcação imuno-histoquímica citoplasmática para CSTA.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas dos controles positivo e negativo para a proteína CSTA. (A) Controle positivo em tecido de apêndice humano com marcação citoplasmática. (B) Controle negativo obtido pela omissão do anticorpo primário anti-CSTA em amostra de tecido tumoral mamário. Aumento de 40x. Barra de escala: 20 µm.

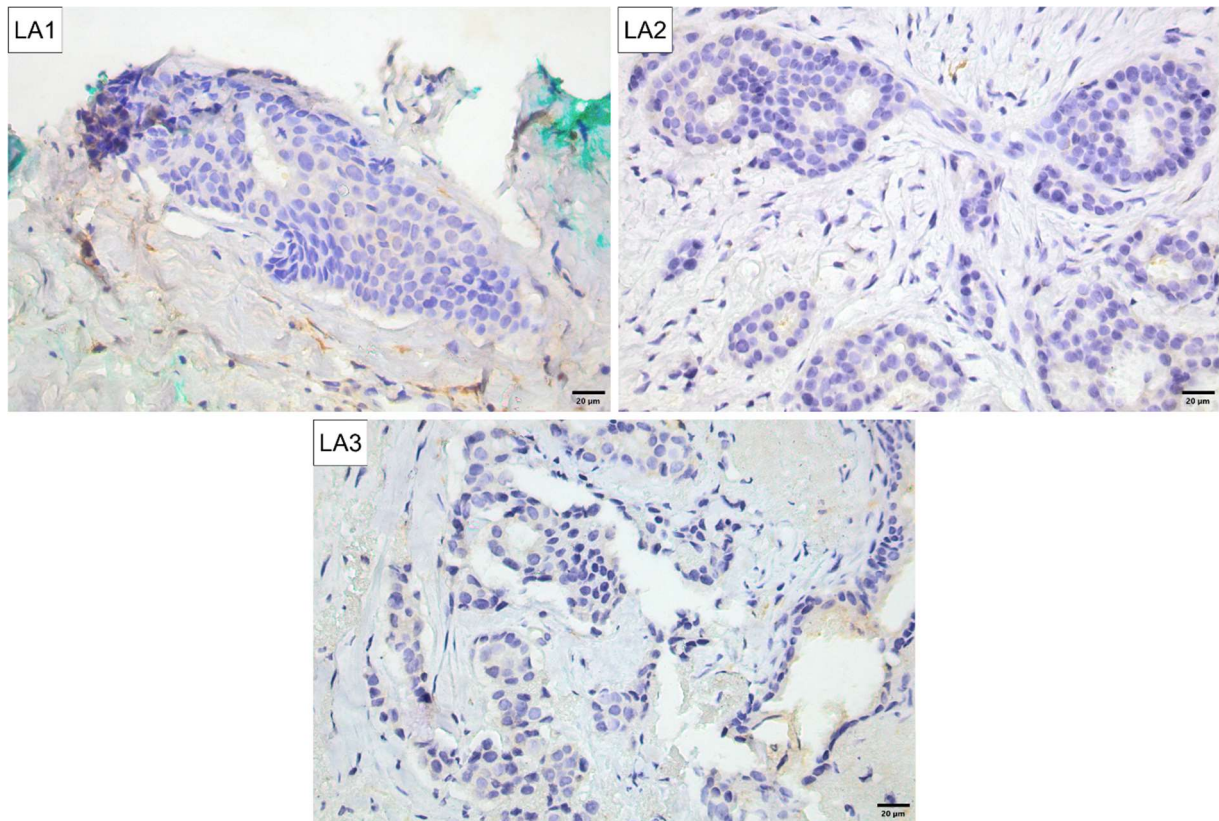
Figura 11 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário triplo-negativo.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para CSTA em amostras de tecido tumoral mamário triplo-negativo, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. T1, T2, T3 e T4 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Triplo-negativo. As setas indicam a marcação citoplasmática positiva para CSTA. Barra de escala: 20 µm.

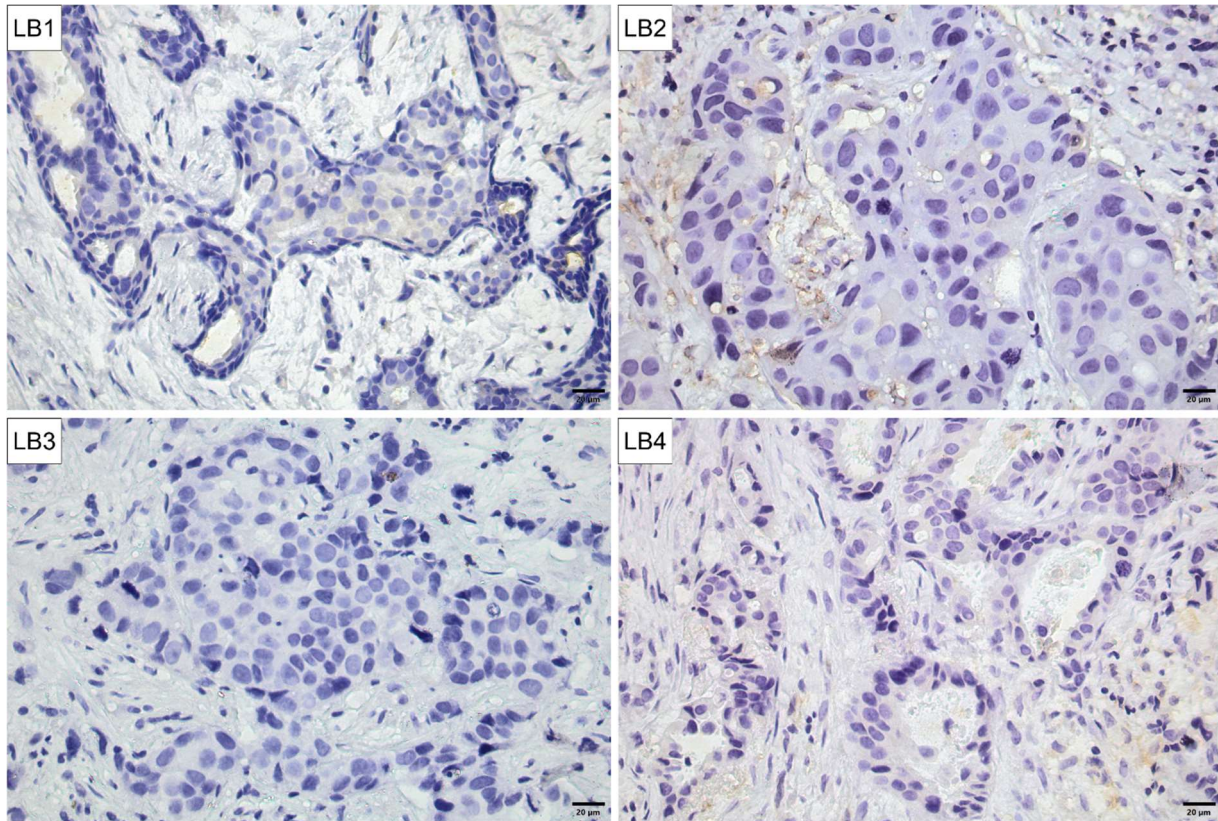
Figura 12 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário luminal A.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para CSTA em amostras de tecido tumoral mamário luminal A, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. LA1, LA2 e LA3 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Luminal A. Barra de escala: 20 µm.

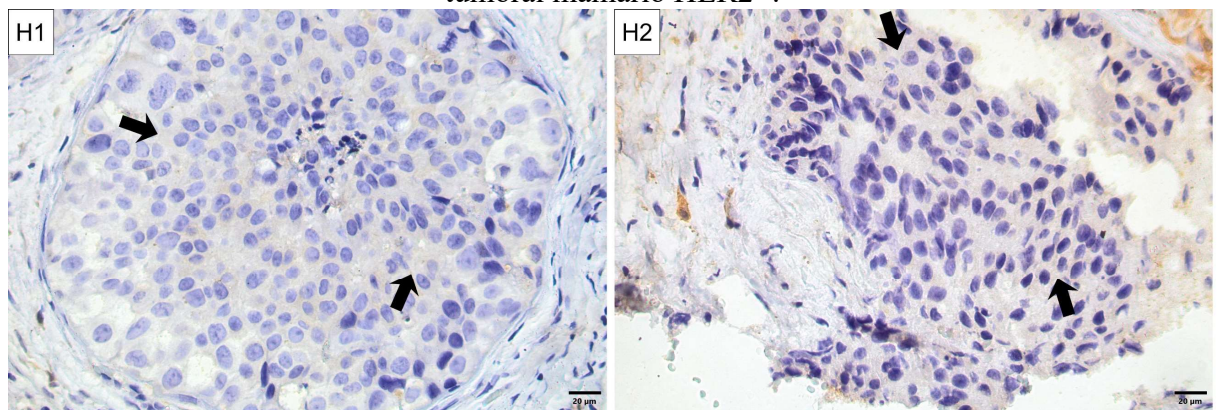
Figura 13 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário luminal B.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para CSTA em amostras de tecido tumoral mamário luminal B, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. LB1, LB2, LB3 e LB4 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Luminal B. Barra de escala: 20 µm.

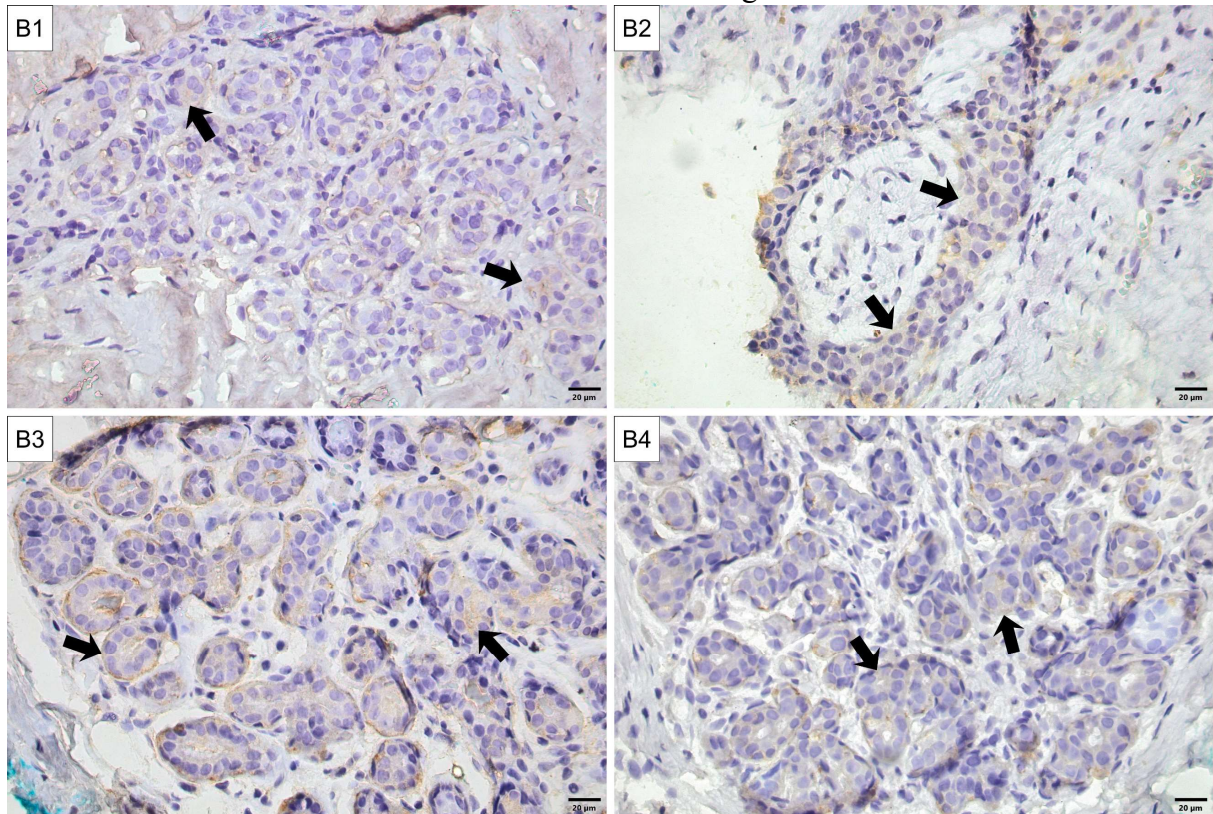
Figura 14 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido tumoral mamário HER2+.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para CSTA em amostras de tecido tumoral mamário HER2+, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. H1 e H2 correspondem aos *pools* de amostras do grupo HER2+. As setas indicam a marcação citoplasmática positiva para CSTA. Barra de escala: 20 µm.

Figura 15 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína CSTA em amostras de tecido mamário com lesões benignas.

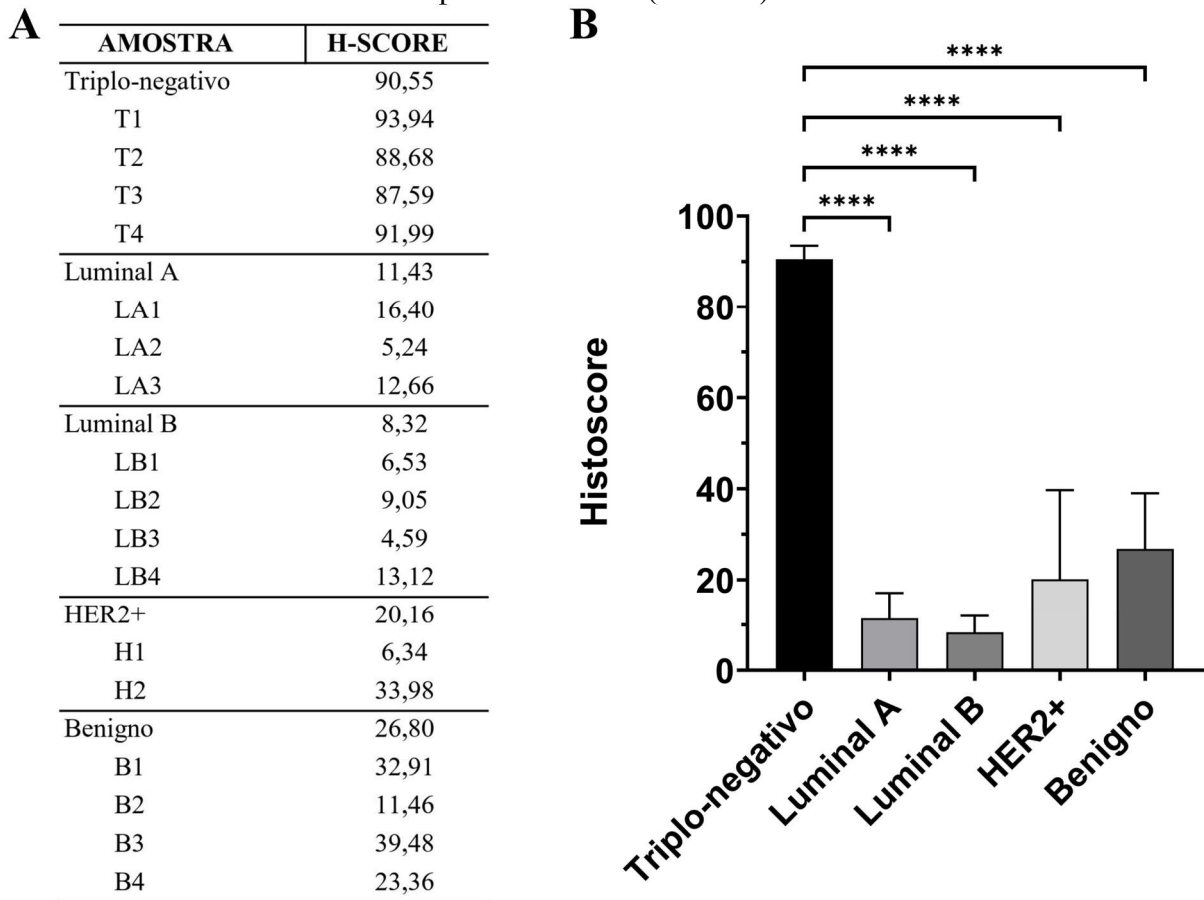


Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para CSTA em amostras de tecido mamário com lesões benignas, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. B1, B2, B3 e B4 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Benigno. As setas indicam a marcação citoplasmática positiva para CSTA. Barra de escala: 20 µm.

A análise quantitativa foi realizada por meio do cálculo do H-score citoplasmático, considerando a intensidade da marcação e o percentual de células positivas. Os valores individuais de cada *pool* estão representados na Figura 16A. Os dados apresentaram distribuição normal segundo o teste de Shapiro-Wilk, permitindo a utilização do teste de One-way ANOVA. A análise revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Em seguida, foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunnett, utilizando o grupo Triplo-negativo como referência. Os resultados demonstraram expressão significativamente maior de CSTA no grupo Triplo-negativo em comparação com os demais grupos com valor de $p < 0,0001$ (Figura 16B).

Figura 16 – Análise quantitativa da detecção citoplasmática de CSTA por imuno-histoquímica pelo Histscore (H-score).



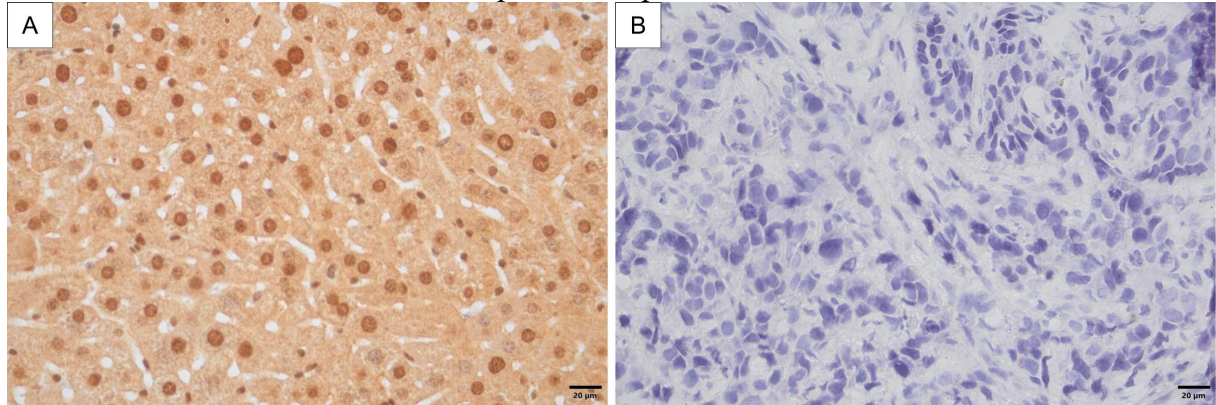
Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: (A) Valores de H-score obtidos a partir da avaliação da marcação imuno-histoquímica citoplasmática para CSTA nas amostras de tecido tumoral dos grupos analisados: Triplo-negativo, Luminal A, Luminal B, HER2+ e Benigno. (B) Comparação dos valores médios de H-score entre os grupos. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística: **** - $p < 0,0001$.

Para a proteína H2A, os controles positivo e negativo da marcação imuno-histoquímica estão representados na Figura 17. A marcação de H2A foi visualizada pela coloração marrom, principalmente no núcleo das células positivas, indicada pelas setas pretas nas Figuras 18 a 22, podendo também apresentar marcações citoplasmáticas em alguns casos, indicadas pelas setas brancas nas mesmas figuras. Observaram-se padrões de marcação nuclear e citoplasmática em todos os tumores do grupo Triplo-negativo (Figura 18) e em campos isolados dos *pools* LA1 (Figura 19), LB3 (Figura 20) e H2 (Figura 21). Marcações exclusivamente nucleares foram observadas nos *pools* LB2 e LB4 do grupo Luminal B (Figura 20), enquanto marcações exclusivamente citoplasmáticas foram observadas nos *pools* LA2 (Figura 19), H1 (Figura 21), B1 e B4 (Figura 22). As marcações nucleares mais intensas foram observadas no grupo Triplo-negativo, que também apresentou heterogeneidade entre os *pools*

analisados. Nos demais grupos, as marcações foram predominantemente de baixa intensidade ou ausentes.

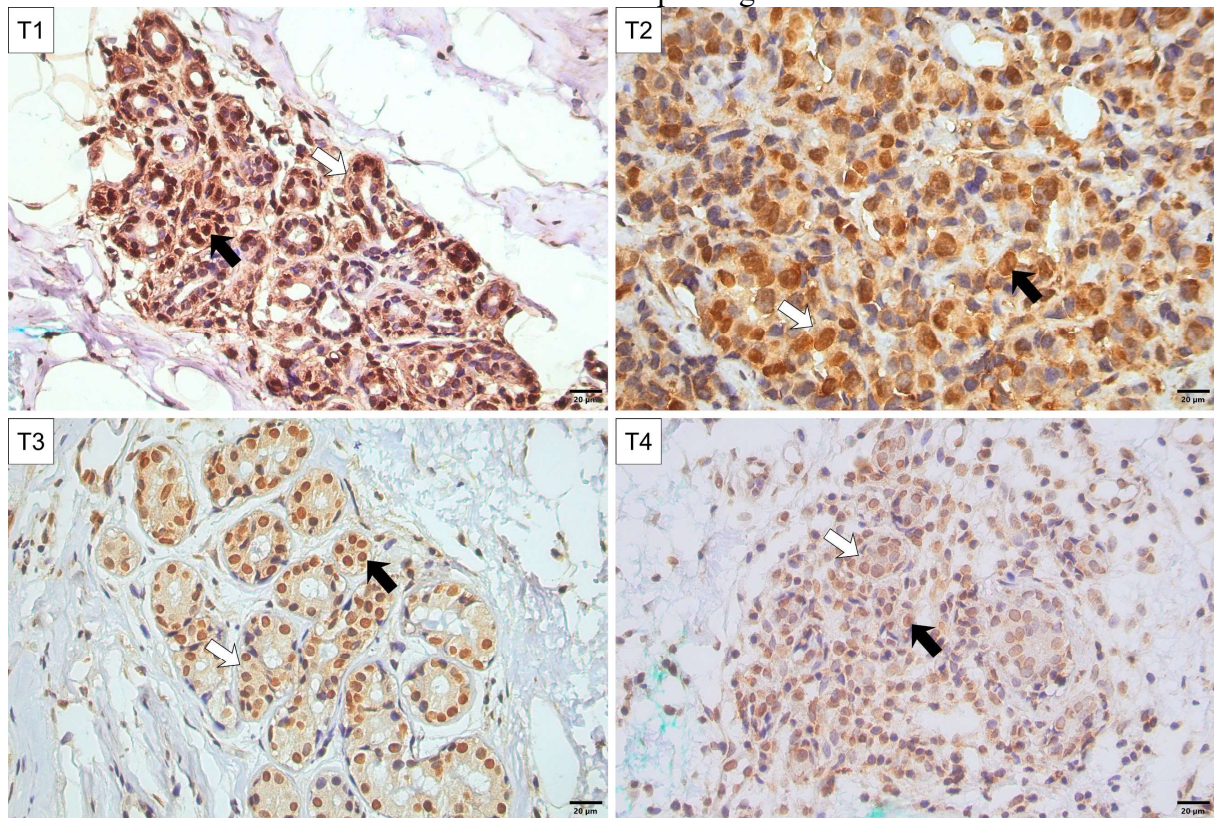
Figura 17 – Controles positivo e negativo da marcação imuno-histoquímica nuclear e citoplasmática para H2A.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para H2A nos controles positivo e negativo. (A) Controle positivo em tecido de fígado humano com marcação nuclear e citoplasmática. (B) Controle negativo obtido pela omissão do anticorpo primário anti-H2A em amostra de tecido tumoral mamário. Aumento de 40x. Barra de escala: 20 µm.

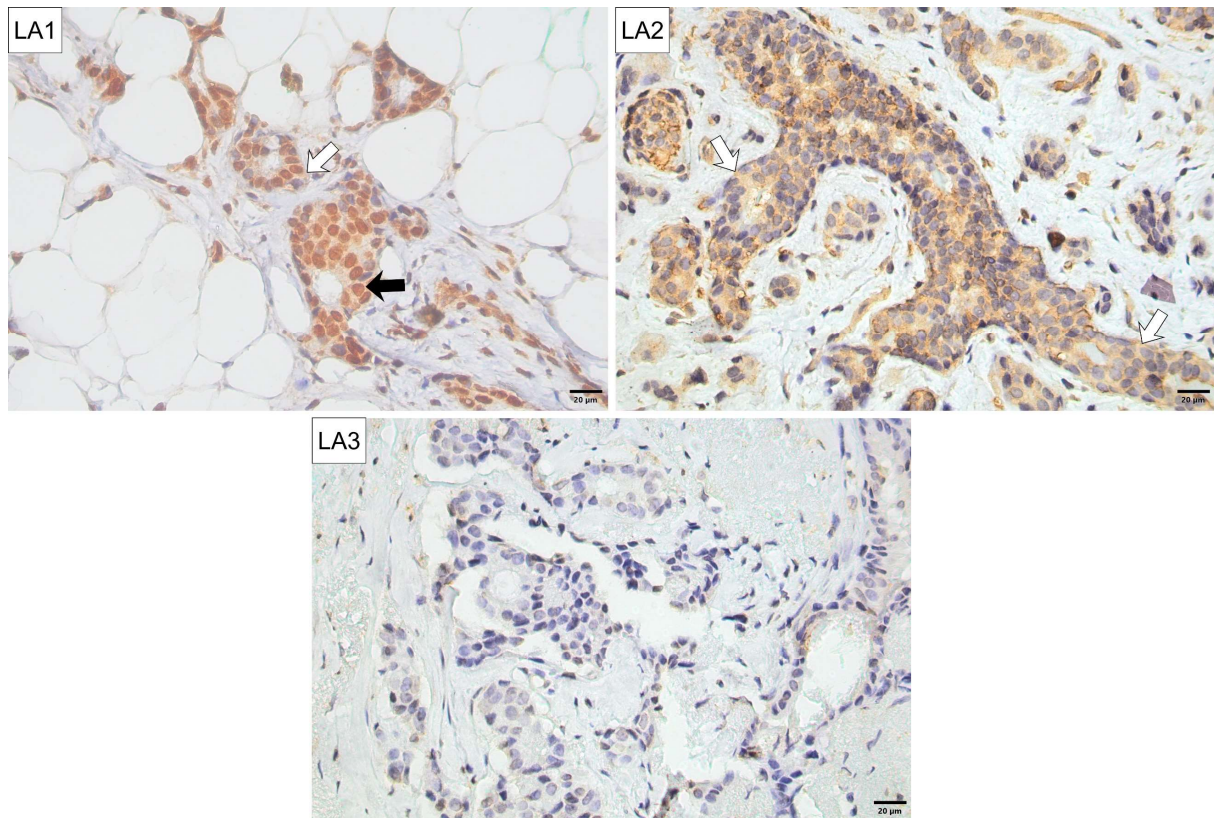
Figura 18 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário triplo-negativo.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para H2A em amostras de tecido tumoral mamário triplo-negativo, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. T1, T2, T3 e T4 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Triplo-negativo. As setas pretas indicam a marcação nuclear, enquanto as setas brancas indicam a marcação citoplasmática. Escala de barra: 20 μm.

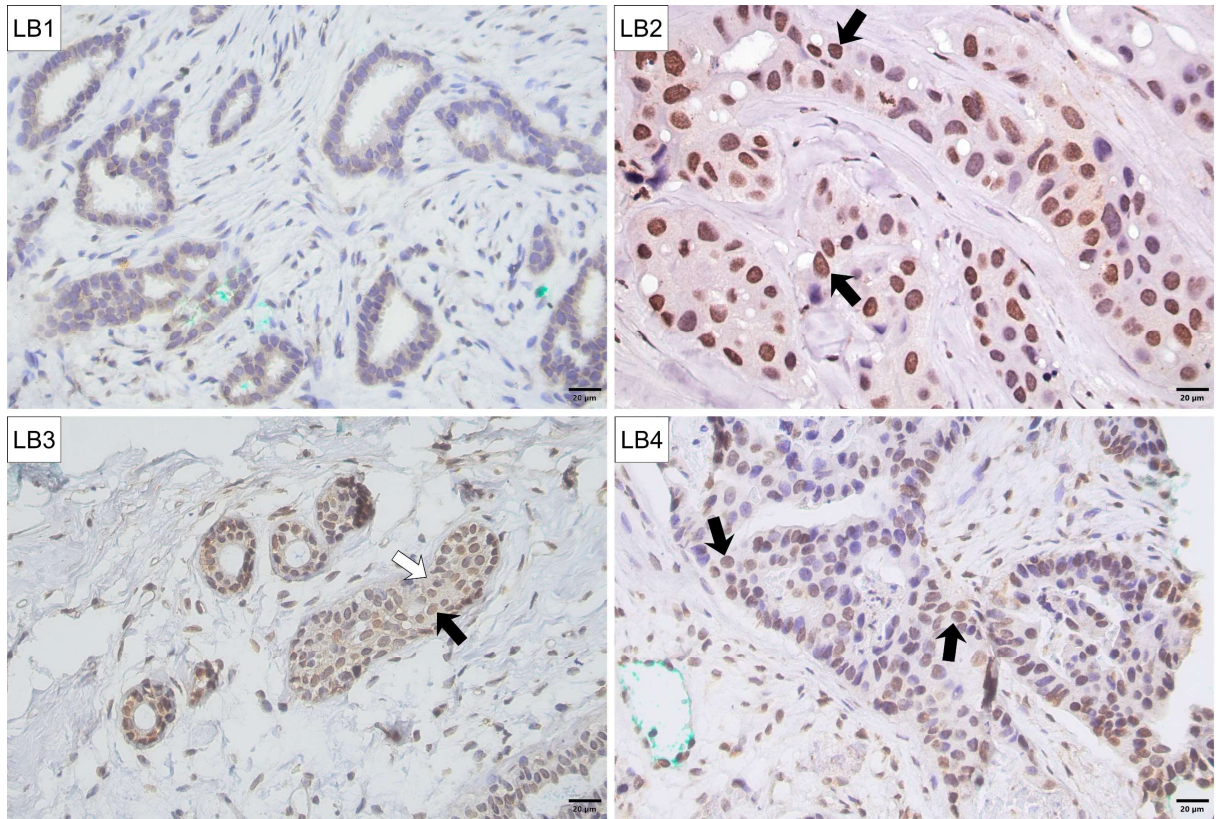
Figura 19 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário luminal A.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para H2A em amostras de tecido tumoral mamário luminal A, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. LA1, LA2 e LA3 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Luminal A. As setas pretas indicam a marcação nuclear, enquanto as setas brancas indicam a marcação citoplasmática. Escala de barra: 20 μm.

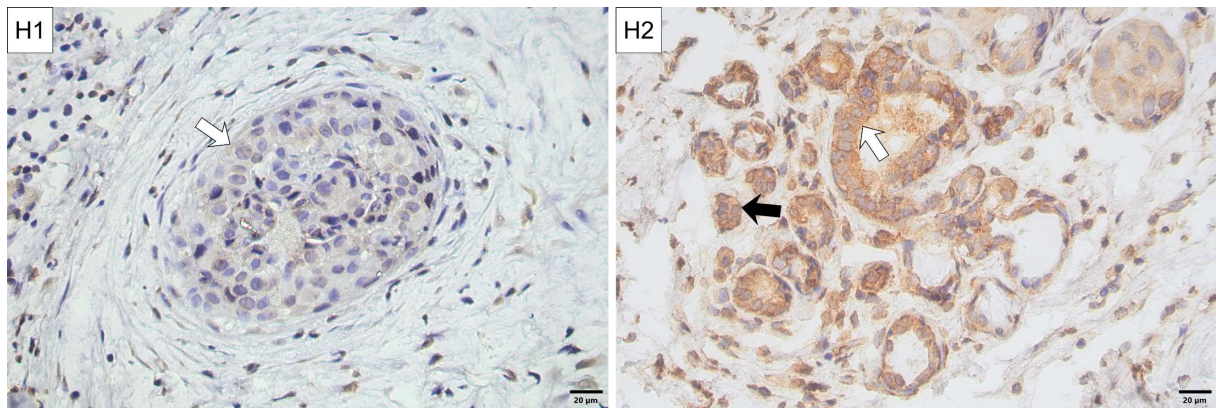
Figura 20 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário luminal B.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para H2A em amostras de tecido tumoral mamário luminal B, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. LB1, LB2, LB3 e LB4 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Luminal B. As setas pretas indicam a marcação nuclear, enquanto as setas brancas indicam a marcação citoplasmática. Escala de barra: 20 µm.

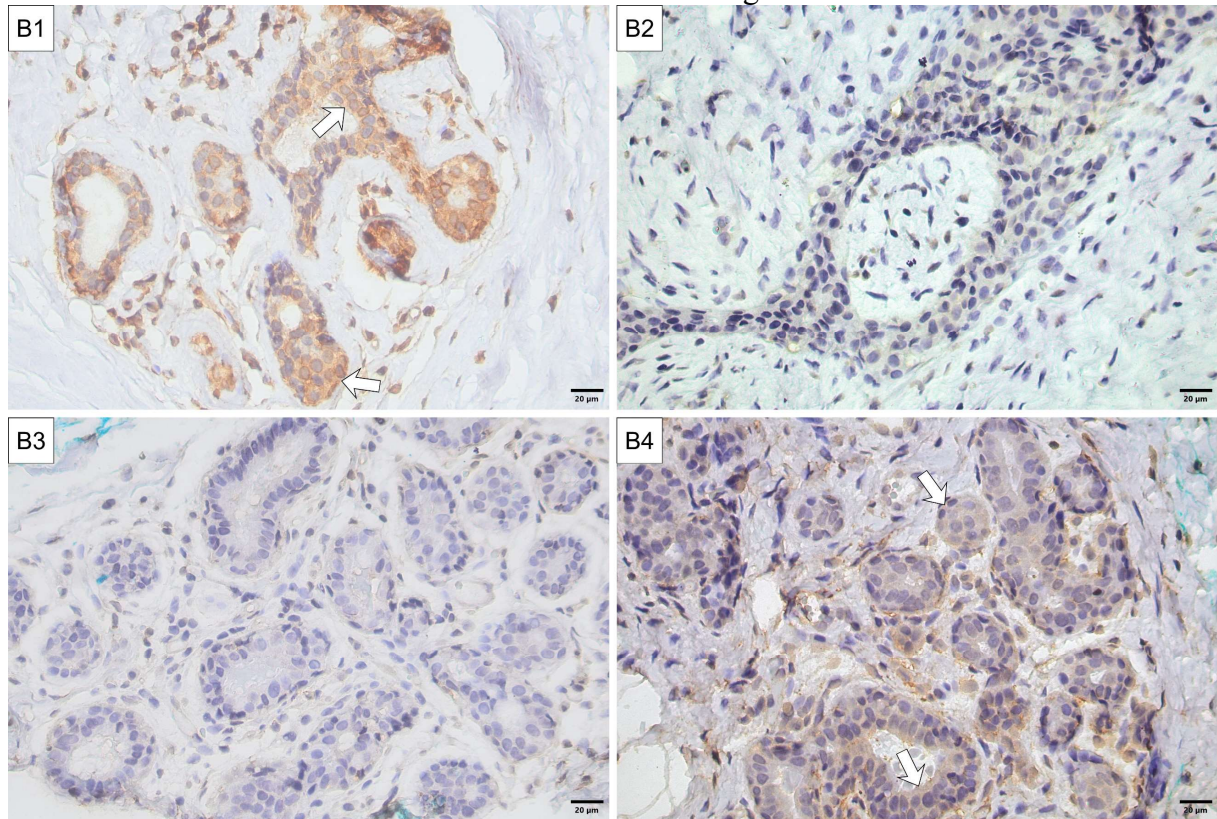
Figura 21 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido tumoral mamário HER2+.



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para H2A em amostras de tecido tumoral mamário HER2+, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. H1 e H2 correspondem aos *pools* de amostras do grupo HER2+. As setas pretas indicam a marcação nuclear, enquanto as setas brancas indicam a marcação citoplasmática. Escala de barra: 20 µm.

Figura 22 – Detecção por imuno-histoquímica da proteína H2A em amostras de tecido mamário com lesões benignas.

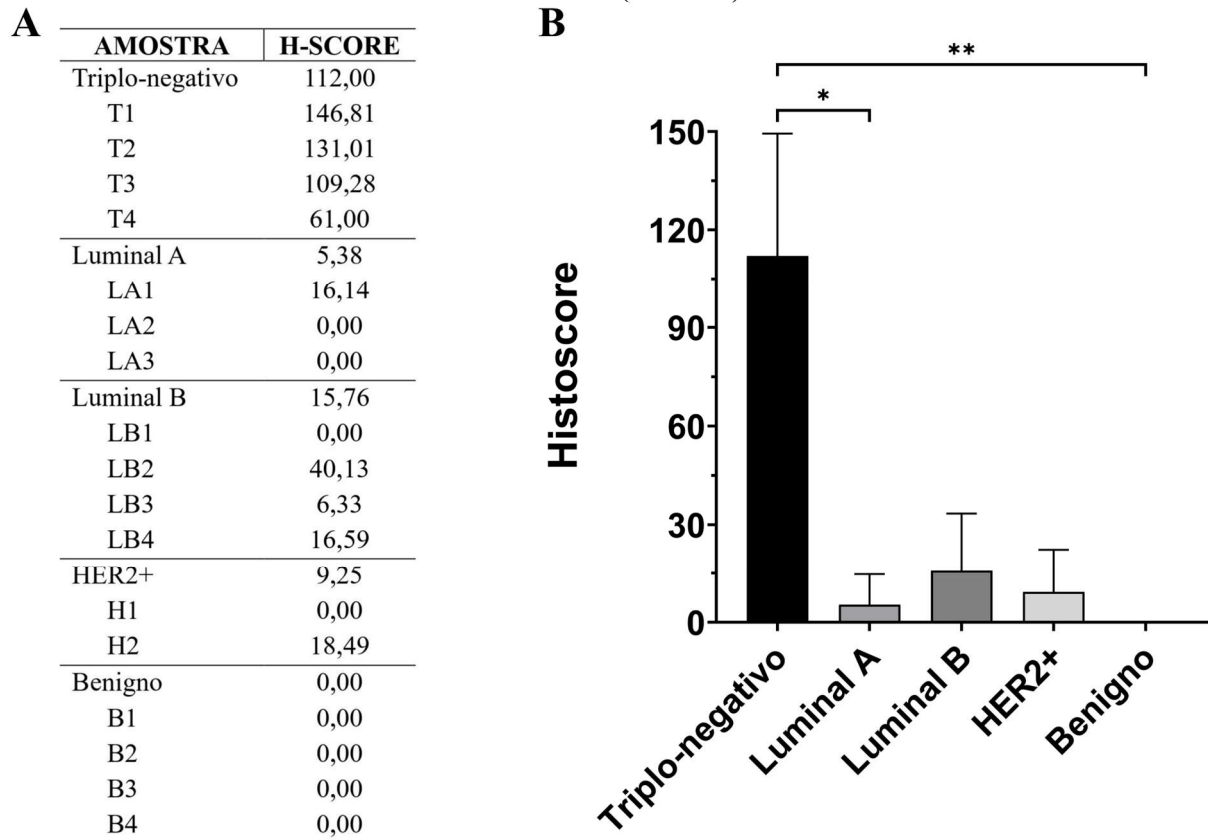


Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: Fotomicrografias representativas da marcação imuno-histoquímica para H2A em amostras de tecido mamário com lesões benignas, obtidas por *core biopsy*, com aumento de 40x. B1, B2, B3 e B4 correspondem aos *pools* de amostras do grupo Benigno. As setas brancas indicam a marcação citoplasmática. Escala de barra: 20 µm.

A análise quantitativa foi realizada por meio do cálculo do H-score nuclear, considerando a intensidade da marcação e o percentual de células positivas. Os valores individuais de cada *pool* estão representados na Figura 23A. A distribuição de dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e, em razão da ausência de normalidade, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0178$). Em seguida, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando o grupo Triplo-negativo como referência. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Triplo-negativo e os grupos Luminal A ($p = 0,0484$) e Benigno ($p = 0,0046$) (Figura 23B).

Figura 23 – Análise quantitativa da detecção nuclear de H2A por imuno-histoquímica pelo Histoscore (H-score).

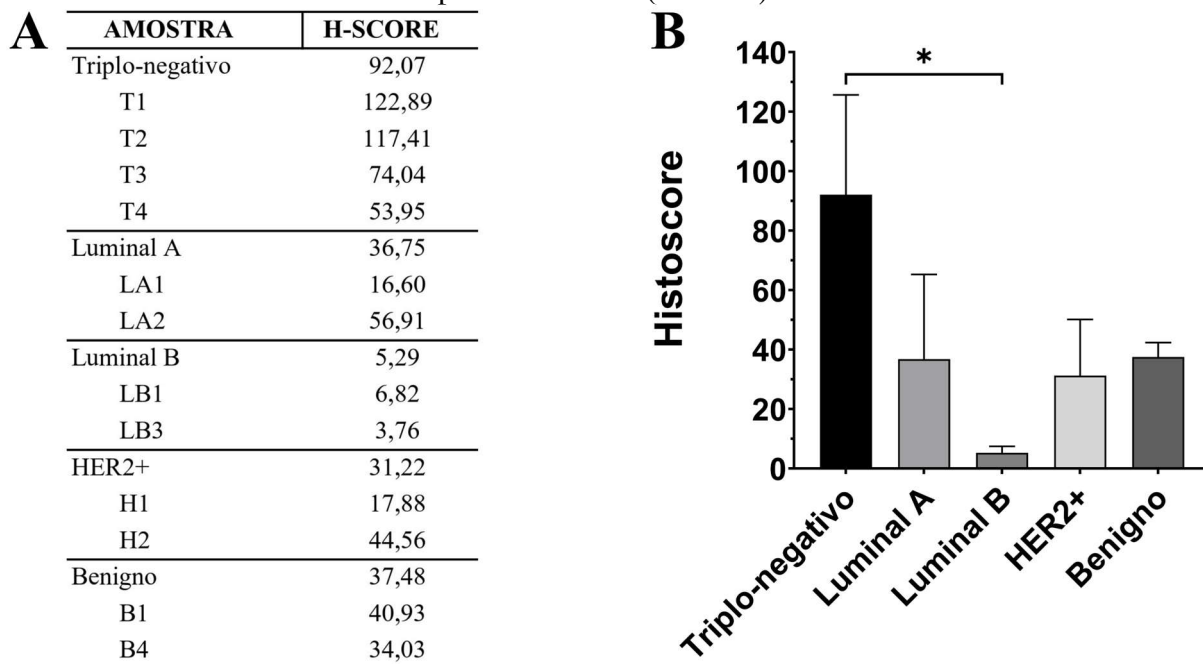


Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: (A) Valores de H-score obtidos a partir da avaliação da marcação nuclear para H2A nas amostras de tecido tumoral dos grupos analisados: Triplo-negativo, Luminal A, Luminal B, HER2+ e Benigno. (B) Comparação dos valores médios de H-score entre os grupos. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Também foi realizada a análise quantitativa por meio do cálculo do H-score citoplasmático nos casos em que essa marcação foi observada, considerando a intensidade da marcação e o percentual de células positivas. Os valores individuais de cada *pool* estão representados na Figura 24A. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que demonstrou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0236$). Posteriormente, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Dunn, considerando o grupo Triplo-negativo como referência, o que revelou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Luminal B ($p = 0,0203$) (Figura 24B), o qual apresentou um valor médio de H-score aproximadamente 17 vezes inferior que o observado no grupo Triplo-negativo.

Figura 24 – Análise quantitativa da detecção citoplasmática de H2A por imuno-histoquímica pelo Histoscore (H-score).



Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: (A) Valores de H-score obtidos a partir da avaliação da marcação citoplasmática para H2A nas amostras de tecido tumoral dos grupos analisados: Triplo-negativo, Luminal A, Luminal B, HER2+ e Benigno. (B) Comparação dos valores médios de H-score entre os grupos. As barras representam média $\pm$ desvio padrão. Diferença estatística: * - $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as proteínas histona H2A e cistatina A como possíveis candidatas a biomarcadores do câncer de mama triplo-negativo por meio da análise de vesículas extracelulares plasmáticas e da expressão dessas proteínas em amostras de tecido tumoral. De modo geral, ambas as proteínas apresentaram maiores níveis de expressão no grupo Triplo-negativo, tanto na análise das VEs quanto na imuno-histoquímica. A quantificação proteica nas VEs revelou um aumento significativo da CSTA em relação aos grupos Luminal A e Benigno, enquanto a H2A apresentou aumento em relação aos grupos Luminal B, Benigno e Controle. Adicionalmente, a análise do tecido tumoral revelou maior expressão de ambas as proteínas nos tumores do grupo Triplo-negativo, com a expressão de CSTA superior à observada nos demais grupos. Para a H2A, foram observados aumentos significativos na expressão nuclear em relação aos grupos Luminal A e Benigno, e na expressão citoplasmática em relação ao grupo Luminal B. Em conjunto, esses dados sugerem uma possível associação dessas proteínas com características biológicas relacionadas ao fenótipo mais agressivo do câncer de mama.

O isolamento e a caracterização das VEs por meio da combinação das técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho e ultracentrifugação mostraram-se eficientes para a obtenção de nanopartículas compatíveis com VEs (Lee *et al.*, 2023; Welsh *et al.*, 2024). Os valores médios de tamanho observados por NTA variaram entre 130 nm e 150 nm, estando dentro da faixa descrita para exossomos e microvesículas, ou VEs pequenas (Abhange *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023; Théry *et al.*, 2018; Yaker *et al.*, 2020). A análise por microscopia eletrônica de transmissão confirmou a presença das VEs pela visualização de estruturas delimitadas por membrana e morfologia semelhante à de uma taça, ou cúpula, como descrito na literatura, e o grupo Controle apresentou VEs com morfologia mais irregular possivelmente em decorrência do processamento da amostra (Cizmar; Yuana, 2017; Jurj *et al.*, 2020; Théry *et al.*, 2018). Não foram observadas diferenças expressivas entre os grupos analisados que pudessem sugerir alterações na população de VEs em função da presença de lesões benignas ou dos diferentes subtipos tumorais. Em conjunto, esses resultados confirmam o isolamento bem-sucedido das VEs em todos os grupos analisados, com características morfológicas condizentes com a literatura (Théry *et al.*, 2018).

Em relação à caracterização das VEs por Western blotting, embora CD63 e CD81 sejam amplamente utilizados como marcadores de pequenas vesículas extracelulares, sua expressão pode variar de acordo com a origem e o tipo de amostra analisada. Estudos com VEs

de linhagens celulares de câncer de mama detectaram os marcadores CD63 e CD81 (Ding; Wang; Pei, 2026; Risha *et al.*, 2020). Em contrapartida, estudos com VEs derivadas de amostras de sangue (plasma ou soro) de indivíduos com câncer de mama utilizam principalmente o marcador CD9, frequentemente associado a ALIX e HSP70 como marcadores positivos, e a calnexina como controle negativo (Ekström *et al.*, 2026; Ngo *et al.*, 2026; Walyeldeeen *et al.*, 2026; Talat *et al.*, 2026). Esses achados demonstram que não existe um painel único de marcadores para a caracterização de VEs, refletindo também a heterogeneidade biológica dessas estruturas. Assim, a ausência de detecção total de CD63 e a detecção parcial de CD81 não excluem completamente a presença de VEs, uma vez que as amostras também foram caracterizadas por NTA e TEM. Entretanto, os resultados do Western blotting devem ser interpretados com cautela, pois a composição das VEs e fatores metodológicos, como a ausência de quantificação proteica e de outros marcadores de VEs, podem ter influenciado esses resultados. A ausência ou detecção limitada desses marcadores pode estar relacionada à baixa quantidade de proteínas obtidas após o isolamento das VEs, às diferenças na expressão das tetraspaninas entre as populações de VEs presentes no plasma ou à sensibilidade do ensaio de Western blotting. Apesar dessa limitação, os resultados obtidos por NTA e TEM fornecem evidências complementares da presença de nanopartículas com tamanho e morfologia compatíveis com as VEs, contribuindo para sua caracterização.

A quantificação da proteína CSTA nas VEs plasmáticas revelou aumento estatisticamente significativo no grupo Triplo-negativo em comparação aos grupos Luminal A e Benigno. Esses resultados corroboram parcialmente os achados de John Mary *et al.* (2017), que observaram uma relação inversamente proporcional entre a expressão de CSTA e a do receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$) em tumores primários, ou seja, tumores com baixa ou nenhuma expressão desse receptor, como os tumores triplo-negativos, apresentaram níveis mais elevados de CSTA.

Já a quantificação da proteína H2A nas VEs plasmáticas revelou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Triplo-negativo e os grupos Luminal B, Benigno e Controle. Esse achado está alinhado aos dados de Tutanov *et al.* (2023) e os complementa, uma vez que os autores demonstraram níveis elevados de H2A na circulação de pacientes com câncer de mama, cuja presença foi atribuída à associação dessa proteína nuclear a complexos nucleoproteicos circulantes. Assim, nossos resultados sugerem que, além de estar associada a complexos nucleoproteicos circulantes, a H2A também pode estar presente em VEs plasmáticas.

Porém, apesar de os resultados indicarem um potencial distinto para cada proteína como biomarcador, fatores metodológicos e biológicos devem ser considerados para uma interpretação mais abrangente. Primeiramente, a estratégia de *pooling*, embora necessária para viabilizar as análises diante das limitações de tempo e recursos disponíveis, pode ter contribuído para a redução da variabilidade biológica individual das amostras. Dessa maneira, diferenças presentes entre as participantes individualmente podem ter sido mascaradas durante o *pooling*, dificultando a detecção de alterações mais sutis entre os grupos analisados. Além disso, o câncer de mama é uma doença heterogênea, especialmente o subtipo triplo-negativo, que pode ser subdividido em diferentes subgrupos moleculares e apresenta elevada diversidade biológica (Lehmann *et al.*, 2011; Rakha *et al.*, 2022). A composição proteica das VEs também pode variar mesmo entre pacientes de um mesmo grupo e subtipo, reduzindo a capacidade de discriminação das análises realizadas a partir de *pools* de amostras. Outro ponto relevante é o fato de que as VEs não necessariamente refletem de forma proporcional a expressão observada nos tecidos tumorais em sua carga molecular, de modo que proteínas altamente expressas nas células tumorais podem não estar igualmente representadas nas VEs liberadas na circulação sanguínea (Liao *et al.*, 2024; Lim *et al.*, 2024).

A análise imuno-histoquímica demonstrou um aumento na expressão da proteína H2A no tecido tumoral do grupo Triplo-negativo, principalmente na marcação nuclear, como esperado em função de seu papel biológico (Su *et al.*, 2013), quando comparado aos demais grupos analisados, com destaque para os grupos Luminal A e Benigno. A marcação citoplasmática observada em algumas amostras também apresentou valores superiores no grupo Triplo-negativo, sugerindo uma possível associação dessa proteína com os mecanismos biológicos característicos desse subtipo tumoral mais agressivo, em concordância com os resultados apresentados por Hua *et al.* (2008). A presença de histonas no citoplasma tem sido observada em condições associadas ao estresse celular e à progressão tumoral, conforme revisado por Nicolaes e Soehnlein (2024). Nessas condições, essas proteínas deixam de atuar exclusivamente como componentes da cromatina e passam a desempenhar funções como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) (Richards *et al.*, 2022; Silk *et al.*, 2017). No microambiente tumoral, as histonas extracelulares podem atuar como mediadores biológicos e interagir com receptores de superfície celular, como TLR2, TLR4 e TLR9, desencadeando cascatas pró-inflamatórias que influenciam a progressão tumoral (Kawai *et al.*, 2016; Silk *et al.*, 2017).

A maior expressão de H2A observada nas amostras de CMTN neste estudo pode refletir uma maior demanda por proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica

e na reorganização da cromatina durante o estresse celular. Lai e Chan (2024) demonstraram que a desregulação e o acúmulo de variantes de H2A estão associados à instabilidade genômica e à progressão tumoral, podendo representar um indicativo de prognóstico desfavorável.

A proteína CSTA apresentou aumento significativo da expressão no tecido tumoral do grupo Triplo-negativo em comparação com os demais grupos analisados, o que sugere uma associação dessa proteína com fenótipos tumorais mais agressivos. Considerando as características proliferativas, invasivas e metastáticas do CMTN, esse achado reforça a hipótese da participação da proteína CSTA em mecanismos biológicos relacionados à progressão tumoral. Os resultados observados estão de acordo com Kuopio *et al.* (1998), que associaram níveis elevados de CSTA a características de maior agressividade em tumores mamários, além de sugerirem que a expressão de CSTA não é uniforme no tumor, o que pode estar relacionado à heterogeneidade observada neste estudo entre os diferentes *pools*. De maneira semelhante, Levičar *et al.* (2002) demonstraram uma associação entre a expressão dessa proteína e alterações no tecido tumoral mamário, além de observarem o aumento de sua expressão em relação ao tecido mamário normal. Por outro lado, os achados de John Mary *et al.* (2017, 2020) evidenciam resultados conflitantes na literatura científica e demonstram uma possível dualidade no comportamento da proteína CSTA que, embora tenha uma correlação inversamente proporcional entre a sua expressão e o receptor de estrogênio alfa (ER α), a CSTA também pode apresentar expressão reduzida em tumores primários quando comparados a tecidos normais, sugerindo que essa proteína possa atuar como supressor tumoral no microambiente mamário. Essas divergências podem estar relacionadas às metodologias empregadas, às características das amostras, aos critérios de classificação tumoral e à heterogeneidade biológica do câncer de mama (Pierri *et al.*, 2026).

No contexto tumoral, a proteína CSTA pode exercer funções biológicas complexas, além da sua função tradicional como inibidora de proteases cisteínicas. O aumento de sua expressão observado neste estudo pode representar uma resposta compensatória ao aumento da atividade proteolítica, característica de tumores mais agressivos, com o objetivo de modular processos associados à invasão celular. Esses resultados corroboram os achados de Parker *et al.* (2007), que demonstraram que tecidos tumorais malignos mais agressivos apresentam o aumento da expressão de CSTA, possivelmente em uma tentativa de conter a degradação da matriz extracelular mediada por proteases. Além disso, Duivenvoorden *et al.* (2017) demonstraram que a CSTA está localizada em células mioepiteliais de tecidos mamários saudáveis e de lesões benignas de baixo grau, atuando como uma barreira protetora. À medida

que o tumor progride, essa barreira é perdida e observa-se aumento da expressão de CSTA, sugerindo uma possível resposta compensatória do microambiente tumoral.

Um dos achados mais relevantes deste estudo foi a comparação entre os resultados obtidos na biópsia líquida e na análise tecidual. Embora a quantificação por ELISA nas VEs tenha sido capaz de diferenciar o grupo Triplo-negativo dos demais grupos, a expressão dessas proteínas mostrou-se mais robusta na análise tecidual, principalmente a CSTA, cuja expressão foi superior à observada nos demais grupos. A análise das VEs apresentou uma pequena dispersão e variabilidade individual nos valores do grupo Triplo-negativo, e essa diferença pode ser explicada pela maior complexidade biológica das VEs circulantes, cuja composição não reflete exclusivamente o tecido tumoral, mas também diferentes tecidos e tipos celulares do organismo. Dessa forma, os sinais moleculares específicos do tumor podem ser diluídos na circulação, dificultando a identificação de biomarcadores. Esses achados reforçam a necessidade de validação em coortes independentes e da utilização de abordagens metodológicas complementares.

Algumas limitações devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Embora a estratégia de *pooling* tenha sido fundamental para viabilizar a realização das análises, ela representa uma limitação metodológica para a validação por ELISA, uma vez que tende a homogeneizar as amostras e reduzir a variabilidade biológica individual, diminuindo a capacidade de identificar diferenças individuais. Em uma amostragem mais restrita, variações biológicas de amostras individuais podem ter exercido maior influência sobre o *pool* em que estão alocadas, causando a variação observada nas técnicas realizadas. Além disso, não foram realizados experimentos funcionais capazes de esclarecer os mecanismos biológicos associados à expressão de H2A e CSTA. Dessa forma, estudos futuros com maior número de participantes e análises individuais serão necessários para confirmar e aprofundar os achados observados.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que as proteínas H2A e CSTA apresentam potencial relevância biológica no contexto do câncer de mama triplo-negativo. Embora a detecção dessas proteínas em VEs plasmáticas apresente resultados promissores, a análise tecidual apresentou maior destaque, evidenciando maior expressão no grupo Triplo-negativo e sugerindo uma possível participação dessas proteínas em mecanismos relacionados à agressividade tumoral. Portanto, esses achados contribuem para a compreensão da biologia do câncer de mama triplo-negativo e fornecem subsídios para futuras investigações destinadas à validação dessas proteínas como potenciais biomarcadores e à avaliação de seu possível papel como alvos terapêuticos.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu caracterizar o perfil clínico, demográfico e histopatológico das pacientes incluídas, contemplando diferentes subtipos de câncer de mama, lesões benignas e indivíduos saudáveis, contribuindo para a caracterização das diferentes condições avaliadas.

As VEs plasmáticas foram isoladas por meio da combinação de cromatografia por exclusão de tamanho e ultracentrifugação e caracterizadas por análise de rastreamento de nanopartículas, microscopia eletrônica de transmissão e Western blotting, permitindo a avaliação de parâmetros, como concentração, tamanho, morfologia e expressão de marcadores clássicos. Esses resultados forneceram material adequado para a investigação das proteínas de interesse no contexto da biópsia líquida.

Na avaliação das proteínas H2A e CSTA nas VEs plasmáticas por ELISA, foram observadas diferenças entre os grupos avaliados. Para CSTA, foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Triplo-negativo e os grupos Luminal A e Benigno. Para H2A, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo Triplo-negativo e os grupos Luminal B, Benigno e Controle. Esses achados indicam que os níveis de H2A e CSTA nas VEs plasmáticas diferem entre o CMTN e alguns dos grupos avaliados.

Na análise por imuno-histoquímica, a CSTA apresentou marcação citoplasmática mais intensa no grupo Triplo-negativo em comparação com os demais grupos avaliados. A H2A apresentou marcações tanto nucleares quanto citoplasmáticas, com diferenças estatisticamente significativas na expressão nuclear entre o grupo Triplo-negativo e os grupos Luminal A e Benigno, enquanto na expressão citoplasmática, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos Triplo-negativo e Luminal B. Esses resultados demonstram diferenças na expressão das proteínas H2A e CSTA no tecido tumoral mamário do grupo Triplo-negativo em relação aos grupos avaliados, reforçando seu potencial como candidatas a biomarcadores.

Em conjunto, os resultados deste estudo corroboram os achados previamente descritos para as proteínas H2A e CSTA e indicam seu potencial como candidatas a biomarcadores do câncer de mama triplo-negativo, tanto no contexto da biópsia líquida quanto na análise do tecido tumoral. Entretanto, os achados obtidos devem ser considerados como evidências iniciais, sendo necessários estudos adicionais, com maior número de amostras, análises individuais, grupos independentes de validação e a avaliação de parâmetros de desempenho diagnóstico para determinar sua aplicabilidade clínica. Dessa forma, o presente

estudo contribui para a ampliação do conhecimento sobre a biologia do câncer de mama triplo-negativo e estabelece uma base para futuras investigações sobre a relevância biológica e a possível aplicação clínica das proteínas H2A e CSTA como biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- ABHANGE, Komal *et al.* Small extracellular vesicles in cancer. **Bioactive Materials**, [S.L.], v. 6, n. 11, p. 3705-3743, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.015>.
- ALIX-PANABIÈRES, Catherine; MARCHETTI, Dario; LANG, Julie E.. Liquid biopsy: from concept to clinical application. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-4, 7 dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48501-x>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS. **What is cancer?** 2025. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html>.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER - AJCC. **AJCC Cancer Staging Manual**. 7. ed. New York: Springer, 2010.
- BAO, Ligang *et al.* Prognostic genes of triple-negative breast cancer identified by weighted gene co-expression network analysis. **Oncology Letters**, 11 nov. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11079>.
- BUTLER, Marcus W. *et al.* Modulation of Cystatin A Expression in Human Airway Epithelium Related to Genotype, Smoking, COPD, and Lung Cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 7, p. 2572-2581, 16 fev. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-2046>.
- CHEN, Haixia *et al.* Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 21 ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00909>.
- CIZMAR, Petr; YUANA, Yuana. Detection and characterization of extracellular vesicles by transmission and cryo-transmission electron microscopy. In: KUO, W.; JIA, S. (eds) **Extracellular Vesicles**. New York: Humana Press, 2017. (Methods in Molecular Biology, v. 1660). p. 221–232. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7253-1_18.
- CONNAL, Siobhan *et al.* Liquid biopsies: the future of cancer early detection. **Journal Of Translational Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-18, 11 fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03960-8>.
- CSERNI, Gábor *et al.* The new TNM-based staging of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 472, n. 5, p. 697–703, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>.
- DENKERT, Carsten *et al.* Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. **The Lancet**, [S.L.], v. 389, n. 10087, p. 2430-2442, jun. 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32454-0).
- DIAZ, Luis A.; BARDELLI, Alberto. Liquid Biopsies: genotyping circulating tumor DNA. **Journal Of Clinical Oncology**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 579-586, 20 fev. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/jco.2012.45.2011>.

DING, Sheng; WANG, Jian; PEI, Jing. Breast cancer-derived exosomal miR-92a-3p stimulates malignant progression by driving TLR4/NF- κ B-mediated macrophage M2 polarization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 795, p. 153124, jan. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.153124>.

DOBRA, Gabriella *et al.* Small Extracellular Vesicles Isolated from Serum May Serve as Signal-Enhancers for the Monitoring of CNS Tumors. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 21, n. 15, p. 1-20, 28 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21155359>.

DUIVENVOORDEN, Hendrika M. *et al.* Myoepithelial cell-specific expression of stefin A as a suppressor of early breast cancer invasion. **The Journal of Pathology**, v. 243, n. 4, p. 496-509, 31 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.4990>.

EKSTRÖM, Karin *et al.* Plasma extracellular vesicles reflect response and prognosis in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant treatment. **Breast Cancer Research**, 9 jan. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-025-02209-0>.

FAKHRI, Nada *et al.* Risk factors for breast cancer in women: an update review. **Medical OncologySpringer**, 1 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01804-x>.

FENG, Yixiao *et al.* Breast cancer development and progression: risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 77-106, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

FERLAY, Jacques *et al.* **Global Cancer Observatory**: Cancer Today. Lyon, França: International Agency for Research on Cancer. 2024. Disponível em: <https://gco.iarc.who.int/today>.

FÜLLGRABE, J.; HAJJI, N.; JOSEPH, B. Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 8, p. 1238-1243, 14 maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.58>.

GASPAR, Laetitia S. *et al.* Simple and Fast SEC-Based Protocol to Isolate Human Plasma-Derived Extracellular Vesicles for Transcriptional Research. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 18, p. 723-737, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.07.012>.

HUA, Sujun *et al.* Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. **Molecular Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 188, jan. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/msb.2008.25>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA (Brasil). **Conceito e Magnitude**: Definição do câncer de mama e dados de incidência e mortalidade no Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA (Brasil). **Controle do câncer de mama no Brasil: dados e números: 2024**. Rio de Janeiro: INCA, 2024. 69 p. ISBN 978-65-58817-69-

7. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/controle-do-cancer-de-mama-no-brasil-dados-e-numeros-2024>.

JENSEN, Kristian *et al.* A novel quantitative immunohistochemistry method for precise protein measurements directly in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens: analytical performance measuring HER2. **Modern Pathology**, v. 30, n. 2, p. 180-193, 21 out. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.176>.

JIANG, Xuanzhao; SOBOLEVA, Tatiana A.; TREMETHICK, David J. Short Histone H2A Variants: Small in Stature but not in Function. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 867, 2 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9040867>.

JOHN MARY, Dixcy Jaba Sheeba *et al.* Interplay of ER α binding and DNA methylation in the intron-2 determines the expression and estrogen regulation of cystatin A in breast cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 504, p. 110701, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110701>.

JOHN MARY, Dixcy Jaba Sheeba *et al.* The role of cystatin A in breast cancer and its functional link with ER α . **Journal Of Genetics And Genomics**, [S.L.], v. 44, n. 12, p. 593-597, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.10.001>.

JURJ, Ancuta *et al.* A Comprehensive Picture of Extracellular Vesicles and Their Contents. Molecular Transfer to Cancer Cells, **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 298, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12020298>.

KAWAI, Chihiro *et al.* Circulating extracellular histones are clinically relevant mediators of multiple organ injury. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 4, p. 829-843, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.025>.

KHORASANIZADEH, Sepideh. The Nucleosome. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 259-272, jan. 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00044-3).

KOMURA, Takuya *et al.* Clinical features of cystatin A expression in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer Science**, v. 108, n. 11, p. 2122-2129, 8 out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cas.13396>.

KORNBERG, Roger D.; LORCH, Yahli. Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 285-294, ago. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81958-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81958-3).

KOUZARIDES, Tony. Chromatin Modifications and Their Function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, fev. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.

KUOPIO, Teijo *et al.* Cysteine proteinase inhibitor cystatin A in breast cancer. **Cancer Research**, [S.L.], p. 432-436, 01 fev. 1998.

LAH, Tamara T. *et al.* Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 50, n. 1, p. 36-44, 2 jan. 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910500109>.

LAI, Po Man; CHAN, Kui Ming. Roles of histone H2A variants in cancer development, prognosis, and treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 6, p. 3144, 9 mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25063144>.

LEE, Yujin *et al.* Recent advances of small extracellular vesicle biomarkers in breast cancer diagnosis and prognosis. **Molecular Cancer**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-22, 16 fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01741-x>.

LEHMANN, Brian D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 121, n. 7, p. 2750-2767, 1 jul. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI45014>.

LEHMANN, Brian D; PIETENPOL, Jennifer A. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. **The Journal Of Pathology**, [S.L.], v. 232, n. 2, p. 142-150, 10 dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.4280>.

LEVIČAR, Nataša *et al.* Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients. **Cancer Detection and Prevention**, v. 26, n. 1, p. 42-49, mar. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0361-090x\(02\)00015-6](https://doi.org/10.1016/s0361-090x(02)00015-6).

LIAO, Haiyan *et al.* Tumor-derived extracellular vesicle proteins as new biomarkers and targets in precision oncology. **Journal of Molecular Medicine**, 30 maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-024-02452-6>.

LIM, Woojeong *et al.* Recent advances in chemical biology tools for protein and RNA profiling of extracellular vesicles. **RSC Chemical Biology**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d3cb00200d>.

LIU, Xiaobei; JIA, Yining; ZHENG, Chao. Recent progress in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy detection of biomarkers in liquid biopsy for breast cancer. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 14, n. 1400498, p. 1-14, 8 jul. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1400498>.

LOPES, Beatriz C. *et al.* MiR-210 and miR-152 as Biomarkers by Liquid Biopsy in Invasive Ductal Carcinoma. **Journal Of Personalized Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 31, p. 1-17, 6 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jpm11010031>.

ŁUKASIEWICZ, Sergiusz *et al.* Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—An updated review. **CancersMDPI**, 1 set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.

MA, Liwei *et al.* Liquid biopsy in cancer: current status, challenges and future prospects. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, 2 dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02021-w>.

MA, Yunxia *et al.* Cystatin A suppresses tumor cell growth through inhibiting epithelial to mesenchymal transition in human lung cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 18, p. 14084-14098, 20 dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23505>.

NASTI, Alessandro *et al.* Cystatin A promotes the antitumor activity of T helper type 1 cells and dendritic cells in murine models of pancreatic cancer. **Molecular Oncology**, 10 jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13796>.

NATIONAL BREAST CANCER FOUNDATION - NBCF (Austrália). **Breast Cancer Anatomy and How Breast Cancer Starts**. 2024. Disponível em: <https://nbcf.org.au/about-breast-cancer/diagnosis/breast-cancer-anatomy/>.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NCI. **Dictionary of Cancer Terms**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>.

NGO, Cao Hoang Long *et al.* Proteomics study of breast cancer-derived small extracellular vesicles: unveiling potential cancer biomarkers. **Journal of Proteome Research**, 19 jan. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5c01143>.

NICOLAES, Gerry A. F.; SOEHNLEIN, Oliver. Targeting extranuclear histones to alleviate acute and chronic inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, jun. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2024.05.008>.

OBEAGU, Emmanuel Ifeanyi; OBEAGU, Getrude Uzoma. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine (United States)**, v. 103, n. 3, p. E36905, 19 jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>.

ORTEGA, Francisco G. *et al.* Sandwich-Type Electrochemical Paper-Based Immunosensor for Claudin 7 and CD81 Dual Determination on Extracellular Vesicles from Breast Cancer Patients. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 1143-1153, 10 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04180>.

PARKER, BS *et al.* Primary tumour expression of the cysteine cathepsin inhibitor Stefin A inhibits distant metastasis in breast cancer. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 3, p. 337-346, 5 nov. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/path.2265>.

PIERRI, Biancamaria *et al.* Tissue-Specific extracellular vesicles enriched from circulation: exploring the liquid biopsy perspective. **Journal of Extracellular Biology**, v. 5, n. 2, 30 jan. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jex2.70106>.

RAKHA, Emad A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 207, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/bcr2607>.

RAKHA, Emad; TOSS, Michael; QUINN, Cecily. Specific cell differentiation in breast cancer: A basis for histological classification. **Journal of Clinical Pathology**, BMJ Publishing Group, 1 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207487>.

RICHARDS, Christy M. *et al.* Extracellular histones as damage-associated molecular patterns in neuroinflammatory responses. **Reviews in the Neurosciences**, 11 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/revneuro-2022-0091>.

RISHA, Yousef *et al.* The proteomic analysis of breast cell line exosomes reveals disease patterns and potential biomarkers. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 11 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70393-4>.

SARHANGI, Negar *et al.* Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular Biology Reports**, [S.L.], v. 49, n. 10, p. 10023-10037, 22 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07571-2>.

SHIBA, Daiki *et al.* Clinicopathological significance of cystatin A expression in progression of esophageal squamous cell carcinoma. **Medicine**, v. 97, n. 15, p. e0357, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/md.00000000000010357>.

SILK, Eleanor *et al.* The role of extracellular histone in organ injury. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 5, p. e2812-e2812, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.52>.

SPORIKOVA, Zuzana *et al.* Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 841-850, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.07.023>.

SU, Chia-Hsin *et al.* An H2A histone isotype regulates estrogen receptor target genes by mediating enhancer-promoter-3'-UTR interactions in breast cancer cells. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 5, p. 3073-3088, 25 dez. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1341>.

TALAT, Liali Yousef *et al.* Large extracellular vesicle-derived latent MMP-8 and gelatinolytically active MMP-2 as potential circulating markers for lymph node metastasis in breast cancer. **Cancers**, v. 18, n. 9, p. 1464, 2 maio 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers18091464>.

TAMARINDO, G. H. *et al.* Distinct proteomic profiles of plasma-derived extracellular vesicles in healthy, benign, and triple-negative breast cancer: candidate biomarkers for liquid biopsy. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, 9 abr. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95232-2>.

TARIGHATI, Elaheh *et al.* A review of prognostic and predictive biomarkers in breast cancer. **Clinical And Experimental Medicine**, [S.L.], p. 1-16, 15 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00781-1>.

THÉRY, Clotilde *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the misev2014 guidelines. **Journal Of Extracellular Vesicles**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-43, 23 nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>.

TSANG, Julia Y.s.; TSE, Gary M.. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances In Anatomic Pathology**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 27-35, 30 abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/pap.0000000000000232>.

TURK, Vito; STOKA, Veronika; TURK, Dušan. Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], p. 5406-5420, 1 maio 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/3089>.

TUTANOV, Oleg *et al.* Comparative analysis of molecular functions and biological role of proteins from cell-free dna-protein complexes circulating in plasma of healthy females and breast cancer patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7279, 14 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24087279>.

VARDABASSO, Chiara *et al.* Histone variants: emerging players in cancer biology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 3, p. 379-404, 8 maio 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1343-z>.

VARGHESE, Frency *et al.* IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96801, 6 maio 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>.

VINIK, Yaron *et al.* Proteomic analysis of circulating extracellular vesicles identifies potential markers of breast cancer progression, recurrence, and response. **Science Advances**, [S.L.], v. 6, n. 40, p. 1-11, 2 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5714>.

WALYELDEEN, Amr Ahmed *et al.* Plasma small-extracellular vesicles' proteomic signature in neoadjuvant chemotherapy-naïve breast cancer patients. **PLOS One**, v. 21, n. 5, p. e0348500, 5 maio 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0348500>.

WELSH, Joshua A. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 13, n. 2, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>.

YAKER, Linda *et al.* Effects of Chronic Kidney Disease and Uremic Toxins on Extracellular Vesicle Biology. **Toxins**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 1-28, 21 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins12120811>.

YIN, Li *et al.* Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-13, 9 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.

YIN, Xuemin *et al.* The Function of H2A Histone Variants and Their Roles in Diseases. **Biomolecules**, v. 14, n. 8, p. 993, 12 ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom14080993>.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Página 1 de 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **(Modelo em acordo com a Resolução nº 466, de 2012 – Conselho Nacional de Saúde)**

Título do estudo: Validação das Proteínas de Vesículas Extracelulares H2A e CSTA como Potenciais Biomarcadores para o Câncer de Mama Triplo-Negativo.

Você está sendo convidada a participar, de forma voluntária, de um estudo científico com o título “Validação das Proteínas de Vesículas Extracelulares H2A e CSTA como Potenciais Biomarcadores para o Câncer de Mama Triplo-Negativo”.

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Este documento é chamado de “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) e explica este estudo e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também fala os possíveis riscos e benefícios referentes à sua participação nesta pesquisa, além de dizer os seus direitos como participante de pesquisa. Após analisar as informações deste Termo de Consentimento e esclarecer todas as suas dúvidas, você terá o conhecimento necessário para tomar uma decisão se deseja participar ou não desta pesquisa.

Não tenha pressa para se decidir!

OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo desse estudo é confirmar se as proteínas histona H2A e cistatina A (CSTA) podem ser utilizadas como marcadores para o câncer de mama triplo-negativo. Para isso, vamos analisar a presença dessas proteínas no sangue e em pequenas estruturas chamadas de vesículas extracelulares, que são liberadas pelas células e podem conter moléculas importantes, e no tecido obtido por biópsia. Além disso, o estudo também vai comparar a presença dessas proteínas com informações sobre as participantes, como o estágio da doença, o tipo de tumor com base nas características das células e tecidos, e a presença de metástases, e comparar com outros tipos de cânceres de mama.

O seguinte estudo pode contribuir para entender melhor se as proteínas H2A e CSTA são úteis como marcadores para o câncer de mama triplo-negativo, fornecendo dados importantes que podem auxiliar no processo de diagnóstico e prognóstico da doença.

COMO SERÁ REALIZADO O ESTUDO

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) será apresentado às participantes da pesquisa no Hospital de Base de São José do Rio Preto, recém-diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo e outros tipos de câncer de mama, e também com tumores de mama benignos, e que ainda não tenham realizado nenhum tipo de tratamento. Após a assinatura do Termo de Consentimento, será feita a coleta de sangue pela equipe de médicos e enfermeiros e, após a biópsia de tecido, que consiste na retirada de uma pequena amostra de tecido da lesão mamária para confirmação do diagnóstico, realizada como parte do procedimento padrão do Hospital de Base de São José do Rio Preto, apenas o resultado dessa biópsia será solicitado ao setor de Patologia. A coleta do resultado será feita com o consentimento da participante da pesquisa para a utilização dos dados na pesquisa científica. Um pedido formal de utilização do material será encaminhado ao setor de Patologia incluindo informações como o código da participante no prontuário e do resultado da biópsia, e o

propósito da pesquisa. Além disso, será assinado um documento fornecido pelo setor de Patologia com uma cópia para o pesquisador principal, indicando a data e o responsável pela retirada do material. Tanto o sangue quanto o tecido serão utilizados para análise da presença das proteínas H2A e CSTA. Além disso, será feita a análise do prontuário da participante para coletar informações sobre os parâmetros como tipo de tumor, estágio da doença e outras informações importantes que possam ajudar no desenvolvimento do estudo.

Você tem o direito de não responder a qualquer questão, sem necessidade de explicação ou justificativa para tal, podendo também se retirar da pesquisa a qualquer momento.

ANONIMATO E CONFIDENCIALIDADE

Suas respostas serão tratadas de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento será divulgado o seu nome ou dados pessoais. Ao utilizarmos seus dados nesta pesquisa, sua privacidade será preservada e todos os esforços serão realizados para que seus dados não sejam expostos/vazados. Seus dados serão anonimizados, isto é, não poderão ser ligados a você assim ficará assegurada a sua privacidade, confidencialidade, a proteção dos seus dados de forma que não sofra discriminação de qualquer natureza.

Os dados coletados serão utilizados apenas NESTA pesquisa e os resultados divulgados em eventos ou revistas científicas apenas para fins de estudo. Após o término da pesquisa, o pesquisador se compromete a enviar os resultados em formato acessível, bem como o acesso aos resultados de quaisquer achados que forem encontrados.

Como participante da pesquisa você pode acessar gratuitamente todos os resultados e informações do estudo sempre que desejar. Para isso, basta entrar em contato com a pesquisadora responsável, Débora de Lima Alves, pelo telefone ou e-mail fornecidos no final deste documento. Os resultados disponíveis incluem informações sobre a presença das proteínas histona H2A e cistatina A no sangue, nas pequenas estruturas chamadas vesículas extracelulares, e no tecido de biópsia. Se você preferir não receber essas informações, sua escolha será respeitada.

Se as suas amostras de sangue e/ou biópsia de tecido forem perdidas ou destruídas, você será informado pela pesquisadora responsável. Além disso, tomaremos medidas para proteger suas informações, como é seu direito como participante da pesquisa.

RISCOS, DESCONFORTOS E BENEFÍCIOS

Se você aceitar participar desse estudo, será feita uma coleta de sangue, que é semelhante a um exame de rotina. Será retirado uma pequena quantidade de sangue, cerca de 5 a 10 mL, de uma veia do seu braço. A coleta é um procedimento simples e seguro. Você precisará estar sentada e com o braço esticado. Será usado um elástico para ajudar a veia a aparecer melhor, o local será limpo, uma agulha fina será inserida na veia para coletar o sangue em um tubo. Depois, a agulha e o elástico serão removidos, e será aplicado um pouco de pressão com uma gaze ou algodão para parar o sangramento e, seguido por um curativo. Mesmo sendo um procedimento simples, pode causar alguns efeitos colaterais temporários, como: desconforto ou dor no local, sangramento leve, tontura, desmaio, hematomas (manchas arroxeadas no braço), inchaço leve no local e, raramente, infecção. Se precisar, oferecemos suporte e/ou encaminhamento para tratamento, sem custo para você, o SUS ou seu plano de

saúde. O sangue coletado será usado apenas para identificar e analisar as proteínas histona H2A e cistatina A.

É possível que você não seja beneficiado diretamente ao participar desta pesquisa, porém sua participação irá contribuir para o desenvolvimento científico na descoberta do potencial dessas proteínas como marcadores para o câncer de mama triplo-negativo, fornecendo dados importantes que podem auxiliar no processo de diagnóstico e prognóstico da doença.

COLETA, ARMAZENAMENTO E UTILIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Ao participar desta pesquisa, você autoriza a coleta do seu material biológico, que inclui sangue e o resultado da biópsia, e seu armazenamento no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC), na Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – SP. Todos os cuidados necessários serão tomados para proteger suas informações pessoais. Esse material será usado exclusivamente para esta pesquisa. Você pode solicitar a retirada do material a qualquer momento, sem causar nenhum prejuízo para você. Se solicitado, o material será descartado de maneira apropriada.

Você tem o direito de retirar sua autorização para a guarda e uso das amostras de sangue e de tecido a qualquer momento. Para isso, basta enviar um pedido por escrito e assinado à pesquisadora responsável, informando que você não deseja mais que as suas amostras sejam usadas. Após receber sua solicitação, devolveremos ou destruiremos suas amostras conforme seu desejo, e essa decisão não causará nenhum problema ou prejuízo para você.

NÃO-PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

Não lhe acontecerá nada se você não quiser participar desta pesquisa, pois sua participação não é obrigatória e você tem o direito de não responder a qualquer questão, sem a necessidade de explicação ou justificativa para tal, podendo também se retirar da pesquisa a qualquer momento sem que haja qualquer prejuízo de continuidade de qualquer tratamento nessa instituição, penalidade ou qualquer tipo de dano à sua pessoa. Será mantido total sigilo sobre a sua identidade e a qualquer momento você poderá solicitar que seus dados não sejam utilizados nesta pesquisa.

CUSTO/REEMBOLSO PARA A PARTICIPANTE

Você não terá nenhum tipo de despesa pessoal por participar da pesquisa, durante todo o decorrer do estudo. Você também não receberá pagamento por participar desta pesquisa.

Você será acompanhado e terá assistência imediata, bem como o pesquisador se responsabilizará pela assistência integral das participantes da pesquisa no que se refere às complicações e danos decorrentes da pesquisa, sejam eles diretos ou indiretos, imediatos ou tardios.

A assistência integral a que se refere este Termo de Consentimento não tira seu direito de solicitar indenização por meio de vias judiciais, se quiser.

CONTATO COM O PESQUISADOR E O CEP

Em caso de dúvidas ou problemas com a pesquisa, você poderá procurar a **pesquisadora responsável** Débora de Lima Alves pelo e-mail deboralimalves@gmail.com ou ainda pelo telefone: (11) 99993-0499, no endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 em São José do Rio Preto/SP no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC) - FAMERP, nos horários das 9:00 às 17:00 de segunda à sexta.

Para maiores esclarecimentos, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FAMERP (CEP/FAMERP) está disponível no telefone: (17) 3201-5813 ou pelo e-mail: cepfamerp@famerp.br, localizado na Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 em São José do Rio Preto/SP no horário de funcionamento das 7:30 às 16:00 de segunda à sexta.

O CEP (Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos) é um grupo formado por pessoas que trabalham ou não com pesquisa e que realizam a revisão ética inicial e contínua do estudo para manter sua segurança e proteger seus direitos.

Este documento foi feito em duas vias, uma com a participante e outra com a pesquisadora responsável pelo estudo, sendo ambas as vias compostas pelas rubricas/assinaturas da participante e do pesquisador em todas as páginas deste documento.

Li o TERMO DE CONSENTIMENTO e concordo em participar da pesquisa proposta.

São José do Rio Preto, ____ de _____ de 20 ____ .

Nome Completo da Participante da Pesquisa

Assinatura da Participante da Pesquisa

Pesquisadora Responsável

Débora de Lima Alves

APÊNDICE B – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E EPIDEMIOLÓGICA DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO ESTUDO

ID	IDADE (ANOS)	TIPO HISTOLÓGICO	CLASSIFICAÇÃO	ESTADIAMENTO	IMUNO-HISTOQUÍMICA	METÁSTASE	MENARCA	MÉTODO ANTICONCEPCIONAL	MENOPAUSA	REPOSIÇÃO HORMONAL	TABAGISMO	ETILISMO	SOBREPESO / OBESIDADE	HISTÓRICO FAMILIAR DE CâNCER
T1.1	47	CDIS	Triplo-negativo	cTis N0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 50%	Não	-	ACO	-	-	Sim	-	-	Câncer de Mama
T1.2	69	CDI	Triplo-negativo	cT2 N0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Não	-	-	40 anos	Não	-	-	Obesidade IMC 31.297 kg/m²	-
T1.3	56	CDI	Triplo-negativo	cT2 cN0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 1 KI67: 70%	Não	10 anos	-	46 anos	Não	-	-	Obesidade IMC 34.809 kg/m²	Câncer de Mama
T2.1	60	CDI	Triplo-negativo	T3 N0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 80%	Não	-	-	55 anos	-	Sim	-	Obesidade IMC 30.458 kg/m²	-
T2.2	48	CDI	Triplo-negativo	cT3 N0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 95%	Não	-	-	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 26.673 kg/m²	-
T2.3	33	CDI	Triplo-negativo	cT4b N0 M0	RE: 2% RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 80%	Não	8 anos	LT	-	-	Sim	Sim	Obesidade IMC 33.673 kg/m²	Câncer de Mama
T3.1	44	CDI	Triplo-negativo	cT2 N1 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 30%	Não	-	-	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 25.038 kg/m²	Câncer de Útero
T3.2	47	CDI	Triplo-negativo	cT4b N1 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Não	9 anos	Não	-	-	Sim	-	Obesidade IMC 34.517 kg/m²	Câncer de Mama
T3.3	54	CDI	Triplo-negativo	cT4d N2 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 60%	Não	11 anos	-	49 anos	Não	Ex-tabagista	Não	Obesidade IMC 33.673 kg/m²	Câncer de Pâncreas Câncer de Mama
T3.4	59	CDI	Triplo-negativo	cT2 cN3 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Não	15 anos	LT	50 anos	Não	Sim	Não	Obesidade IMC 30.484 kg/m²	-
T4.1	66	CDI	Triplo-negativo	cT4d N1 M1	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Sim	-	-	50 anos	-	-	-	Obesidade IMC 35.262 kg/m²	-
T4.2	45	CDI	Triplo-negativo	cT4b N2 M1	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Sim	-	-	-	Não	-	-	Obesidade IMC 34,6 kg/m²	Câncer de Mama Câncer de Garganta Câncer de Próstata
T4.3	28	CDI	Triplo-negativo	T4d N3 M1	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Sim	11 anos	ACO	-	-	Não	Sim	Sobrepeso IMC 27,3 kg/m²	Câncer de Ânus Neoplasia - não soube especificar
LA1.1	54	CDI	Luminal A	T1c N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 10%	Não	12 anos	-	-	-	-	-	Obesidade IMC 37.807 kg/m²	-
LA1.2	55	CDI	Luminal A	T2 N0 M0	RE: 95% RP: 50% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 10%	Não	16 anos	-	-	-	Sim	-	Obesidade IMC 33.659 kg/m²	-
LA1.3	47	CDI	Luminal A	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 10%	Não	16 anos	ACO	-	-	-	-	Obesidade IMC 30.102 kg/m²	Sim

LA2.1	55	CDI	Luminal A	T2 N0 M0	RE: 90% RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 1 KI67: 15%	Não	-	Não	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 25.39 kg/m²	-
LA2.2	44	CDI	Luminal A	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 20%	Não	-	LT	43 anos	Não	Sim	-	Obesidade IMC 46.475 kg/m²	-
LA2.3	62	CDI	Luminal A	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: NEGATIVO HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 10%	Não	-	Histerectomia	32 anos	Não	Sim	-	Sobrepeso IMC 29.33 kg/m²	Câncer de Pulmão
LA3.1	51	CDI	Luminal A	T1c N1 M0	RE: > 95% RP: 90% HER2: NEGATIVO - 1 KI67: 5%	Não	11 anos	Não	-	Não	Sim	-	-	Câncer de Estômago e Esôfago Câncer de Próstata
LA3.2	60	CDI	Luminal A	cT2 N1 M0	RE: > 95% RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 1 KI67: 10%	Não	18 anos	-	55 anos	Sim	Sim	-	Sobrepeso IMC 27.701 kg/m²	-
LA3.3	31	CDI	Luminal A	T2 N1 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 7%	Não	-	DIU cobre	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 26,8 kg/m²	-
LA3.4	78	CDI	Luminal A	pT2 pN1a M0	RE: > 95% RP: 50% HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 30 %	Não	-	Histerectomia	40 anos	Não	-	-	Obesidade IMC 44.221 kg/m²	Câncer de Garganta
LA	48	CDI	Luminal A	T1b N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 10%	Não	-	-	-	-	-	-	-	-
LA	45	Carcinoma papilífero sólido	Luminal A	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 20%	Não	12 anos	ACO	-	-	-	-	-	Não
LA	61	CDIS do tipo micropapilar	Luminal A	Não consta	RE: 95% RP: 80% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 5%	-	-	-	47 anos	-	Não	Sim	-	Não
LA	67	CLI	Luminal A	T3 N1 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 10%	Não	-	-	52 anos	Não	Ex-tabagista	-	-	-
LA	36	CDI	Luminal A	T4b N1 M0	RE: 90% RP: 90% HER2: POSITIVO - 3 KI67: 20%	-	11 anos	LT	-	Não	-	-	-	Câncer de Mama
LB1.1	57	CDI	Luminal B	cT1c N0 M0	RE: 90% RP: 50% HER2: NEGATIVO - 1 KI67: 30%	Não	13 anos	-	49 anos	Não	-	-	-	Câncer de Intestino Câncer de Estômago Câncer de Pulmão
LB1.2	39	CDI	Luminal B	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 60%	Não	13 anos	-	-	-	-	-	Obesidade IMC 34.222 kg/m²	-
LB1.3	49	CDI	Luminal B	cT2c N0 M0	RE: > 95% RP: 90% HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 50%	Não	-	-	-	-	Sim	-	Sobrepeso IMC 27.942 kg/m²	-
LB2.1	77	CDI	Luminal B	cT2 N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 30%	Não	13 anos	-	50 anos	Sim	-	-	Sobrepeso IMC 27.849 kg/m²	Câncer de Mama
LB2.2	76	CLI pleomórfico	Luminal B	T2 N0 M0	RE: 90% RP: 40% HER2: POSITIVO - 3 KI67: 80%	Não	14 anos	Histerectomia	46 anos	-	Sim	-	Obesidade IMC 31.931 kg/m²	-
LB2.3	73	Carcinoma mamário invasivo (CDI) com área de padrão micropapilar	Luminal B	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: 90% HER2: POSITIVO - 3 KI67: 70%	Não	14 anos	Histerectomia	Sim	Não	-	-	Sobrepeso IMC 29.938 kg/m²	Câncer de Mama Câncer de Útero Câncer de Pulmão Câncer de Pele

LB3.1	63	CDI	Luminal B	T2c N1 M0	RE: > 95% RP: 30% HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 30%	Não	-	-	44 anos	Não	Sim	Sim	IMC 23.613 kg/m²	-
LB3.2	33	CDI	Luminal B	cT4b N1 M0	RE: > 95% RP: 70% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 50%	Não	-	Injeção hormonal	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 26.26 kg/m²	Câncer de mama
LB3.3	44	CDI	Luminal B	cT4d cN1 M0	RE: 95% RP: 95% HER2: POSITIVO - 3 KI67: 50%	Não	-	Salpingectomy	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 27.662 kg/m²	Câncer de Mama
LB4.1	50	CDI	Luminal B	T2 N0 M1	RE: > 95% RP: NEGATIVO HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 10%	Sim	12 anos	-	48 anos	Não	-	-	Sobrepeso IMC 26.898 kg/m²	-
LB4.2	75	CDI	Luminal B	T4b N1 M1	RE: > 95% RP: 5% HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 20%	Sim	-	-	-	-	-	-	-	-
LB	71	CDI	Luminal B	T1c N0 M0	RE: > 95% RP: > 95% HER2: NEGATIVO - 1 KI67: 50%	Não	-	LT	50 anos	Não	Sim	-	-	Não
LB	63	CDI	Luminal B	T3 N1 M1	RE: > 95% RP: > 95% HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 50%	Sim	-	-	54 anos	Não	-	-	-	Não
LB	64	CLI	Luminal B	T2 N0 M0	RE: > 95% RP: 20% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 30%	Não	-	-	48 anos	Não	-	-	-	Câncer de Endométrio
LB	70	CDI	Luminal B	cT2 N1 M0	RE: > 95% RP: 1% HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 80%	Não	-	-	50 anos	Sim	-	-	-	Não
LB	48	CDIS	Luminal B	Não consta	RE: > 95% RP: > 95 % HER2: DUVIDOSO - 2 KI67: 20%	-	-	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama
LB	63	CDI	Luminal B	cT2 N1 M0	RE: 70% RP: 5% HER2: POSITIVO - 3 KI67: 40%	Não	-	Histerectomia	43 anos	-	-	-	-	Não
LB	50	CDIS	Luminal B	Não consta	RE: 90% RP: 80% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 20%	-	-	ACO	-	Sim	-	-	-	Não
LB	44	Carcinoma papilífero invasivo	Luminal B	T4d N1 M0	RE: 30% RP: 10% HER2: NEGATIVO - 0 KI67: 90%	Não	-	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama Câncer de Ovário
H1.1	51	CDIS	HER2	pTis	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: POSITIVO - 3 KI67: 70%	Não	10 anos	-	50 anos	Não	-	-	Sobrepeso IMC 25.802 kg/m²	-
H1.2	48	CDIS	HER2	pTis	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: POSITIVO - 3 KI67: 5%	Não	18 anos	ACO	-	-	-	-	-	Câncer de Próstata
H1.3	41	CDI	HER2	cT1a N0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: POSITIVO - 3 KI67: 40 %	Não	13 anos	DIU hormonal	-	-	-	-	Obesidade IMC 43.75 kg/m²	-
H1.4	37	Carcinoma microinvasivo (CDI) associado a CDIS	HER2	T2 N0 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: POSITIVO - 3 KI67: POSITIVO	Não	-	-	-	-	Ex-tabagista	Sim	Obesidade IMC 31.956 kg/m²	-
H2.1	30	CDI	HER2	T4d N1 M0	RE: NEGATIVO RP: NEGATIVO HER2: POSITIVO - 3 KI67: 50%	Não	-	-	-	-	-	Sim	IMC 21.09 kg/m²	Câncer de Útero

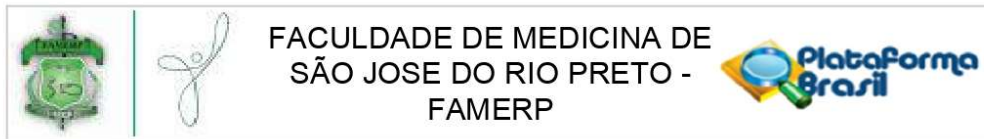
H2.2	58	CDI	HER2	cT4d N2 M0	RE: NEGATIVO RP: 5% HER2: POSITIVO - 3 KI67: 40%	Não	-	Histerectomia	43 anos	-	Ex-tabagista	Não	IMC 22,22 kg/m²	Câncer de Útero
B1.1	20	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	Sim	-	IMC 20,94 kg/m²	Câncer de Mama Câncer de Próstata
B1.2	23	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	13 anos	Não	-	-	-	-	-	-
B1.3	27	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	9 anos	Não	-	-	-	-	-	-
B2.1	28	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	16 anos	Injeção hormonal	-	-	-	-	-	-
B2.2	32	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	12 anos	Não	-	-	-	-	-	Câncer de Estômago
B2.3	35	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	Injeção hormonal	-	-	-	-	Sobrepeso IMC 28,99 kg/m²	-
B3.1	41	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	LT	-	-	-	-	-	-
B3.2	43	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	14 anos	Não	-	-	-	-	-	-
B3.3	47	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	15 anos	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama
B4.1	51	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	13 anos	Não	-	Não	-	-	-	Câncer de Mama
B4.2	53	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	-	51 anos	-	-	Sim	-	Câncer de Próstata Câncer de Estômago
B4.3	60	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	-	52 anos	Não	Ex-tabagista	-	-	Câncer de Mama
B	43	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	12 anos	ACO	-	-	-	Sim	-	Não
B	48	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	LT	-	-	-	-	-	Não
B	58	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	16 anos	-	48 anos	-	Ex-tabagista	-	-	Não
B	43	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	13 anos	ACO	-	-	-	-	-	Não
B	44	-	Benigno	-	-	-	11 anos	ACO	41 anos	-	-	-	-	Leucemia Linfocítica Crônica
B	57	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	12 anos	-	44 anos	-	Ex-tabagista	-	-	Não
B	42	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não
B	54	Hiperplasia ductal usual	Benigno	-	-	-	15 anos	-	45 anos	Não	-	-	-	Não
B	51	Adenose microglandular	Benigno	-	-	-	13 anos	LT	-	-	-	-	-	Câncer de Mama
B	25	Ectasia ductal	Benigno	-	-	-	-	ACO	-	-	-	-	-	Não
B	41	Alteração fibroadenomatóide do estroma	Benigno	-	-	-	11 anos	-	-	-	-	Sim	-	Câncer de Colo de Útero
B	39	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama
B	51	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	16 anos	DIU cobre	-	-	-	-	-	Não
B	54	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	-	53 anos	-	-	-	-	Não
B	32	Fibroadenoma com Hiperplasia ductal usual	Benigno	-	-	-	13 anos	DIU cobre	-	-	-	Sim	-	Câncer ginecológico
B	41	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	14 anos	-	-	-	-	Sim	-	Câncer de Tireoide
B	48	Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não
B	34	Tumor filóides ou fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	Não	-	-	Sim	-	-	Câncer de Mama Câncer de Colo de Útero Câncer de Intestino
B	49	Hiperplasia linfoide folicular reacional	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	47	Adenose microglandular	Benigno	-	-	-	-	ACO	-	-	-	-	-	Não
B	68	Hiperplasia ductal usual	Benigno	-	-	-	-	-	49 anos	Não	Não	Não	-	Não
B	53	Fibroadenoma de padrão pericanalicular	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	42	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	Injeção hormonal	-	-	-	-	-	Não
B	56	Hiperplasia ductal usual	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não
B	37	Fibroadenoma de padrão pericanalicular	Benigno	-	-	-	-	ACO	-	-	-	-	-	Não
B	43	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	11 anos	Histerectomia	-	-	-	-	-	Câncer de Mama Câncer de Útero
B	39	Diversos tipos de lesões	Benigno	-	-	-	11 anos	Não	-	-	Sim	Sim	-	Desconhece
B	41	Adipócitos maduros	Benigno	-	-	-	12 anos	Não	-	-	-	-	-	Não
B	38	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	Não	-	-	Sim	-	-	-
B	71	Hiperplasia ductal usua, Fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	16 anos	-	60 anos	Sim	-	-	-	-
B	36	Hiperplasia ductal usual, fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	Não	-	-	Não	-	-	Câncer de Colo de Útero
B	26	Tumor Filóides Benigno ou Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	12 anos	DIU cobre	-	-	Sim	-	-	Não

B	35	Fibroadenoma	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	48	Hiperplasia ductal usual, cistos, fibrosclerose estromal	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	48	Papiloma intraductal, hiperplasia ductal usual	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	47	Fibroadenoma, adenose microglandular	Benigno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1.1	21	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não
C1.2	26	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sim
C1.3	28	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2.1	32	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não
C2.2	30	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2.3	32	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3.1	38	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3.2	47	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3.3	50	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama Sarcoma de Partes Moles
C4.1	51	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama
C4.2	63	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Câncer de Mama
C4.3	60	-	Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora (2026).

Legenda: CDI: carcinoma ductal invasivo; CDIS: carcinoma ductal *in situ*; CLI: carcinoma lobular invasivo; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER2: fator de crescimento epidérmico humano 2; KI67: índice de proliferação celular; c: estadiamento clínico; p: estadiamento patológico (cirúrgico); T: tumor primário; N: comprometimento lifonodal regional; M: metástase à distância; ACO: anticoncepcional oral; LT: laqueadura tubária; DIU: dispositivo intrauterino; IMC: índice de massa corporal.

ANEXO A – PARECER FAVORÁVEL DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação das Proteínas de Vesículas Extracelulares H2A e CSTA como Potenciais Biomarcadores para o Câncer de Mama Triplo-Negativo

Pesquisador: DEBORA DE LIMA ALVES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82558524.2.0000.5415

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 7.102.646

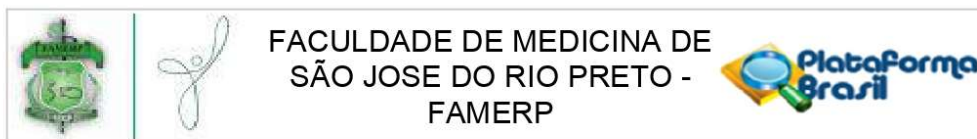
Apresentação do Projeto:

Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2400951.pdf de 17/09/2024) e/ou do Projeto Detalhado/ Brochura do Investigador.

INTRODUÇÃO:

1.1 CÂNCER DE MAMA: FATORES DE RISCO E CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E MOLECULAR O câncer de mama (CM) é a forma de câncer mais predominante e letal entre as mulheres, com estimativas de mais de 2,2 milhões de novos casos e mais de 600 mil mortes no ano de 2022 em todo o mundo (Ferlay et al., 2024). No Brasil, é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres, responsável por mais de 60 mil casos no ano de 2023 e mais de 18 mil mortes no ano de 2021 (INCA, 2023). O desenvolvimento do CM começa quando as células do tecido mamário apresentam um comportamento anômalo, proliferando rapidamente e forma desordenada, além de evitarem a apoptose (Mayo Clinic, 2024; NBCF, 2024). Vários fatores influenciam a formação e progressão da doença, incluindo idade avançada (especialmente em mulheres acima de 50-55 anos), histórico familiar de CM em parentes de primeiro grau, mutações nos genes BRCA1, BRCA2, PTEN e p53, sobrepeso e obesidade, menarca precoce (antes dos 11 anos) e menopausa tardia (após os 55 anos), além do uso de hormônios por contraceptivos orais e pela terapia de reposição hormonal durante a menopausa (Akram et al.,

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, nº 5416, bloco FAEPE, térreo, Sala 2
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 7.102.646

realizada por escrito e assinada, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sendo necessária a devolução/ destruição de TODAS as amostras biológicas coletadas durante o estudo (Resolução CNS n.º 340, de 2004, item III.7; Resolução CNS n.º 441, de 2011, itens 10 e 10.I).

RESPOSTA: Para atendimento à solicitação da opção de retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas, será incluída uma seção na página 3 do TCLE, item COLETA, ARMAZENAMENTO E UTILIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.

Você tem o direito de retirar sua autorização para a guarda e uso das amostras de sangue e de tecido a qualquer momento. Para isso, basta enviar um pedido por escrito e assinado à pesquisadora responsável, informando que você não deseja mais que as suas amostras sejam usadas. Após receber sua solicitação, devolveremos ou destruiremos suas amostras conforme seu desejo, e essa decisão não causará nenhum problema ou prejuízo para você.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

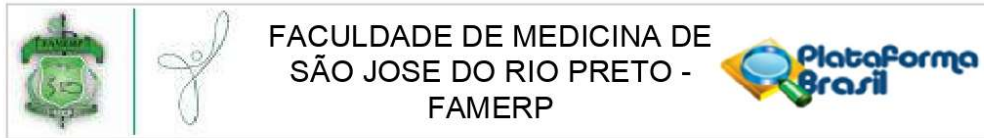
Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n.º 466, de 2012, e na Norma Operacional n.º 001, de 2013, do CNS, manifesta-se pela aprovação do protocolo de 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_2400951.pdf	17/09/2024 13:32:28		Aceito
Outros	Carta_Resposta_para_Pendencias.pdf	17/09/2024 13:31:19	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_versao_limpa.pdf	17/09/2024 13:30:17	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_modificado_destaque.pdf	17/09/2024 13:30:12	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, nº 5416, bloco FAEPE, térreo, Sala 2
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 7.102.646

Ausência	TCLE_modificado_destaque.pdf	17/09/2024 13:30:12	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_modificado_versao_l impa.pdf	17/09/2024 13:29:57	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_modificado_destaqu e.pdf	17/09/2024 13:28:48	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	22/08/2024 10:43:53	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	22/08/2024 10:43:29	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Pesquisadores.pdf	22/08/2024 10:41:20	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Instituicao_e_Infraestrut ura.pdf	22/08/2024 10:41:11	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.pdf	20/08/2024 16:07:57	DEBORA DE LIMA ALVES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 26 de Setembro de 2024

Assinado por:
Heloisa Cristina Caldas
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, nº 5416, bloco FAEPE, térreo, Sala 2
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br