



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATORIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA A SAÚDE

ANANDA CRISTINA FERNANDES DE AGUIAR

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES SIRTUINA 1, RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMO GAMA E INTERLEUCINA 18 EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

RECIFE

2019

ANANDA CRISTINA FERNANDES DE AGUIAR

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES SIRTUINA 1, RECEPTOR ATIVADO POR
PROLIFERAÇÃO DE PEROXISSOMO GAMA E INTERLEUCINA 18 EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

**RECIFE
2019**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Aguiar, Ananda Cristina Fernandes de

Análise de expressão dos genes sirtuína 1, receptor ativado por proliferação de peroxissomo gama e interleucina 18 em pacientes com câncer de mama / Ananda Cristina Fernandes de Aguiar- 2019.

63 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Danielly Bruneska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Aplicada à Saúde. Recife, 2019.
Inclui referências e anexos

1. Câncer de mama 2. Tecido adiposo 3. Sirtuína 1 I. Martins, Danielly
Bruneska Gondim (orient.) II. Título

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-404

ANANDA CRISTINA FERNANDES DE AGUIAR

Análise de expressão dos genes Sirtuina 1, Receptor ativado por proliferação de peroxissomo gama e Interleucina 18 em pacientes com câncer de mama.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 21 / 02 / 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr^a Danyelly Bruneska Gondim Martins
Departamento de Bioquímica, UFPE

Prof. Dr. Fabricio Oliveira Souto
Centro Acadêmico do Agreste, UFPE

Prof.^a Dr^a Maria de Mascena Diniz Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada. Ao meu pai José Cláudio, minha mãe Marizete Correia e a minha irmã Ana Cláudia que me mostraram o caminho certo a seguir e foram meus maiores exemplos de força, paciência e perseverança, pois sem eles eu não teria chegado onde eu cheguei. Agradeço também ao meu noivo Ivandro Arruda, por toda força, paciência e carinho dado, o que foi essencial para que eu conseguisse chegar onde eu estou agora. Agradeço a todos os meus familiares que de perto ou de longe sempre torceram por mim e pela minha vitória em todas as etapas da minha vida.

Agradeço ainda a Danyelly Bruneska, que além de orientadora é também uma amiga, pelo apoio, carinho, compreensão, liberdade e amparo, que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Henrique Castelletti por toda ajuda ao longo do meu projeto e por todo apoio em toda essa caminhada.

Agradeço, por fim, a todas minhas amigas e amigos que me ajudaram a chegar ao fim dessa nova fase.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou
o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou
o que era antes”.*

Marthin Luther King

RESUMO

O câncer de mama é o tipo da doença mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil. O desenvolvimento tumoral é relacionado a mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e células do sistema imunológico, mas atualmente também tem sido relacionado com o Tecido Adiposo. Neste contexto, alguns genes parecem estar associados com o câncer de mama e vias moleculares presentes no tecido adiposo. A SIRT1 é um membro da Família de sirtuínas de histona desacetilases de classe III (HDACs), que participam da regulação de vários processos fisiológicos e vem sendo observadas tanto nos adipócitos, quanto no câncer. Em paralelo o Receptor ativado por proliferação de peroxissomo gama (PPAR γ) é um receptor nuclear tipo II que está associado a tumorigênese e vem sendo observado em pacientes obesos e com diabetes. A IL-18, uma citocina pró inflamatória, já vem sendo correlacionada com vários tipos de cancers devido a suas atividades pró- e anti-cancerígenas e por fazer parte de toda a resposta contra patógenos *no organismo*. **Objetivo:** Investigar o papel dos genes *SIRT1*, *PPAR γ* , e *IL18* nos diferentes subtipos e tratamentos do câncer de mama. **Metodologia:** O RNA total foi obtido de amostras de tecido de mama sadia (n=10) e tumoral de diferentes subtipos (n=57). A expressão relativa dos genes *SIRT1*, *PPAR γ* e *IL-18* foi avaliada por PCR em tempo real. **Resultados:** A expressão relativa da SIRT1 demonstrou um aumento significativo em tecidos tumorais dos subtipos Luminal e Triplo negativo ($p=0,0286$). Também foi observado uma maior expressão do *PPAR γ* e *IL18* nas pacientes do subtipo Luminal, mas apenas no subtipo HER2+ observou-se que todas as pacientes desse grupo expressaram *IL18* e *PPAR γ* . Observou-se também uma correlação direta dos níveis de expressão entre *PPAR γ* e *IL18* ($R^2=0,4501$). **Conclusão:** A expressão dos genes *PPARG* e a *IL18* podem estar correlacionados no tecido mamário neoplásico, sugerindo uma relação entre a adipogênese e regulação da inflamação neste tecido. Tais achados permitem ampliar os conhecimentos sobre o papel do tecido adiposo no câncer de mama, e a longo prazo, identificar marcadores prognóstico e terapêutico.

Palavras-chave: Câncer de mama. Tecido Adiposo. PPAR γ . IL18. SIRT1

ABSTRACT

Breast cancer is the most common type of disease among women in the world and in Brazil. Tumor development is related to inflammatory mediators, including cytokines and immune system cells, but it has also been linked to Adipose Tissue. According to these findings, some genes appear to be associated with breast cancer and via molecules present in adipose tissue. SIRT1 is a member of the Class III histone deacetylases (HDACs) family of sirtuins. They participate in the regulation of various physiological processes and have already been observed in both adipocytes and cancer. The Peroxisome Gamma Proliferation Activated Receptor (PPAR γ) is a nuclear type II receptor that is associated with tumorigenesis and has been observed in obese and diabetic patients. IL-18, a proinflammatory cytokine, has already been correlated with various types of cancer due to its pro- and anti-cancer activities and to be part of the entire response against pathogens in the body. **Objective:** To investigate the role of the SIRT1, PPAR γ , and IL18 genes in the different subtypes and treatments of breast cancer. **Methodology:** Total RNA was obtained from samples of healthy breast tissue (n=10) and tumor of different subtypes (n=57). The relative expression of the SIRT1, PPAR γ and IL-18 genes were evaluated by real-time PCR. **Results:** The relative expression of SIRT1 demonstrated a significant increase in tumor tissues of the Luminal and Triple negative subgroups ($p=0,0286$). It was also observed a greater expression of PPARG and IL18 in patients of the Luminal subtype, but only in the HER2 + subtype, it was observed that all the patients of this group expressed IL18 and PPAR γ . A direct correlation of expression levels between PPAR γ and IL18 ($R^2 = 0.4501$) was also observed. **Conclusion:** Expression of the PPAR γ and IL18 genes may be correlated in neoplastic mammary tissue, suggesting a relationship between adipogenesis and regulation of inflammation in this tissue. These findings allow us to broaden the knowledge about the role of adipose tissue in breast cancer and, in the long term, to identify prognostic and therapeutic markers.

Key words: Breast cancer. Adipose Tissue. PPAR γ . IL18. SIRT1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - INCIDÊNCIA DE CÂNCER DE MAMA NO MUNDO-----	15
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2018 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO-MELANOMA* (INCA, 2018).-----	15
FIGURA 3 - DESENHO ESQUEMÁTICO DE UMA MAMA SADIA. -----	16
FIGURA 4 - HISTÓRIA NATURAL DO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE MAMA -----	16
FIGURA 5 - PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA OS SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA-----	17
FIGURA 6 - MODULAÇÃO FENOTÍPICA DO TECIDO ADIPOSEO -----	21
FIGURA 7 - RELAÇÃO ENTRE SIRT1 E PPARG EM VÁRIOS LOCAIS NO ORGANISMO, OBSERVASSE PRINCIPALMENTE A INTERAÇÃO DELES NO TECIDO ADIPOSEO	22
FIGURA 9 - FORMAÇÃO DE UM COMPLEXO HETEROTRIMÉRICO DE ALTA AFINIDADE PELA IL18, O RECEPTOR DE IL18 BETA E O RECEPTOR DE IL18 ALFA.-----	27
FIGURA 10 - EXPRESSÃO DO GENE SIRT1 NO GRUPO DE 49 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA. -----	34
FIGURA 11 - EXPRESSÃO RELATIVA (Δ CT) DE SIRT1 NOS SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA-----	35
FIGURA 12 - EXPRESSÃO DO GENE PPARG EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA -	36
FIGURA 13 - EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE PPARG (Δ CT) EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA. -----	37
FIGURA 14 - EXPRESSÃO DO GENE IL18 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA. ----	38
FIGURA 15 - EXPRESSÃO RELATIVA (Δ CT) DO GENE IL18 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA. -----	39
FIGURA 16 - REGRESSÃO LINEAR ENTRE OS Δ CTs DOS GENES PPARG E SIRT1. ---	40
FIGURA 17 - REGRESSÃO LINEAR ENTRE OS Δ CTs DOS GENES SIRT1 E IL18. -----	40
FIGURA 18 - REGRESSÃO LINEAR ENTRE OS Δ CTs DOS GENES PPARG E IL18. -----	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA ENVOLVIDAS NO ESTUDO -----	31
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVOS.....	14
1.1.1	Geral	14
1.1.2	Específicos	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Câncer de Mama	15
2.1.1	Epidemiologia	15
2.1.2	Mama normal e neoplásica	16
2.1.3	Diagnóstico do câncer de mama	18
2.1.4	Tratamento do câncer de mama	18
2.2	Tecido Adiposo e Câncer	19
2.2.1	Sirtuína 1 e tecido adiposo	21
2.2.2	Receptores ativados por proliferação de peroxissomo gamma (PPAR γ) no tecido adiposo	23
2.2.3	Interleucina 18 e tecido adiposo	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	População de Estudo	28
3.2	Coleta de Amostras	28
3.3	Tratamento da amostra	28
3.4	Análise de expressão gênica.....	29
3.5	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Caracterização dos pacientes	31
4.2.	Análise de expressão do gene SIRT1 em pacientes com câncer de mama	33
4.3	Análise de expressão do gene PPAR γ em pacientes com câncer de mama	35
4.4	Análises de expressão do gene IL18 em câncer mama	37
4.5	Análise de correlação entre os genes	39
5.	DISCUSSÃO	43
6.	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS.....	47

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP I	53
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP II	54
ANEXO C – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO I	55
ANEXO D – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO II.....	56
ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	61

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Global Cancer Statistics, em todo o mundo, haverá cerca de 2,1 milhões de casos de câncer de mama recém-diagnosticados em 2018, representando quase um em cada quatro casos de câncer entre as mulheres (BRAY et al., 2018). O câncer de mama é o tipo da doença mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do câncer de pele não-melanoma, correspondendo a cerca de 25% e 29% dos casos novos a cada ano, respectivamente. Para 2018, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama no Brasil, sendo o segundo tipo mais frequente nas mulheres das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. O câncer de mama também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2018).

O câncer da mama é um tumor maligno que se desenvolve na mama como consequência de alterações genéticas em algum conjunto de células mamárias, que passam a se dividir descontroladamente. Ocorre, no caso, o crescimento anormal das células mamárias, tanto do ducto mamário quanto dos glóbulos mamários. A carcinogênese mamária é um processo extremamente complexo que pode ser didaticamente dividida em três etapas: iniciação, promoção e progressão (NAZÁRIO; FACINA; FILASSI, 2015). Atualmente, vários estudos estão sendo realizados com a intenção de buscar novos biomarcadores e melhorar o diagnóstico, prognóstico e a terapia utilizada por essas pacientes, para uma melhor qualidade de vida.

O tecido adiposo atualmente está sendo observado no câncer com base em duas observações principais: estudos epidemiológicos que demonstraram uma associação entre obesidade e alguns cânceres (por exemplo, esôfago e endométrio); e que os adipócitos constituem um componente importante do microambiente tumoral para cânceres de mama e de metástase abdominal (por exemplo, gástrico, cólon e ovário), promovendo o crescimento do tumor (NIEMAN et al., 2013).

Alguns estudos já observaram que no tecido adiposo, a sirtuina 1 (SIRT1) controla a lipólise e inibe a inflamação, reprimindo a atividade do receptor ativado por proliferação de peroxissomo gama (PPAR γ) e do NF-kB, auxiliando na supressão da diferenciação do tecido adiposo (MAYORAL et al., 2015; YANG et al., 2006). A SIRT1 é um membro da família de histona desacetilases de classe III (HDACs). Ela está envolvida em uma variedade de processos

fisiológicos, tais como metabolismo, neurogênese e sobrevivência celular, já vem sendo associada a diversos tipos de câncer (CHEN; YUAN; SU, 2013).

Por outro lado, a interleucina 18 (IL18) induz diretamente reguladores da transcrição, resultando na promoção da diferenciação de adipócitos marrons, ativação da termogênese e aumento produção de energia, estando também associada à regulação e à resposta inflamatória do tecido adiposo (YAMANISHI et al., 2018). O gene *IL18* é expresso em vários locais de inflamação crônica, em doenças autoimunes, em uma variedade de cânceres, e no contexto de numerosas doenças infecciosas. Ele pode ser ativado por várias moléculas, uma dessas moléculas é o inflamassoma em especial o NRLP3, que já foi correlacionado com a ativação de IL-18 (AHMAD et al., 2013; MOOSSAVI et al., 2018)

A expressão de IL18 parece ser inibida pelo PPAR γ , receptores ativados por proliferação de peroxissoma (PPARs), também implicados na carcinogênese, têm papéis conhecidos na regulação do metabolismo e da inflamação (BHAT et al., 2017). Dentre os 3 PPARs identificados até o momento, o PPAR γ tem sido o mais estudado e correlacionado com vários tipos de tumores incluindo mama, ovário, próstata, bexiga, gástrico e cólon, bem como em leucemias. Em muitas células de carcinoma pulmonar, a ativação do PPAR γ resulta em diminuição da proliferação celular (ROMAN, 2008).

Considerando os conceitos e informações acima expostos, o presente trabalho tem o objetivo de analisar a expressão dos genes *SIRT1*, *PPARG* e *IL18* nos diferentes subtipos de câncer de mama e sua correlação com o tecido adiposo e com os dados clínicos das pacientes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Investigar o papel dos genes *SIRT1*, *PPAR γ* , e *IL18* nos diferentes subtipos (Luminal A, Luminal B, Triplo Negativo e HER2) e tratamentos do câncer de mama.

1.1.2 Específicos

- Avaliar a expressão dos genes *SIRT1*, *PPAR γ* , e *IL18* nos tecidos tumorais de pacientes com câncer de mama;
- Avaliar a correlação da expressão destes genes com os diferentes subtipos histopatológicos de câncer de mama e suas características clínicas;
- Determinar a correlação entre a expressão destes genes no tecido mamário neoplásico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de Mama

2.1.1 Epidemiologia

De acordo com o *Global Cancer Statistics*, em todo o mundo, haverá cerca de 2,1 milhões de casos de câncer de mama recém-diagnosticados em 2018, representando quase um em cada quatro casos de câncer entre as mulheres. A doença é o câncer mais diagnosticado na grande maioria dos países (**Figura 1**), e a principal causa de morte por câncer em mais de 100 países (BRAY et al., 2018). No Brasil, estima-se 59.700 casos novos e mais de 2000 mortes por câncer de mama para o estado de Pernambuco (**Figura 2**) (INCA, 2018).

Figura 1. Incidência de Câncer de mama no mundo

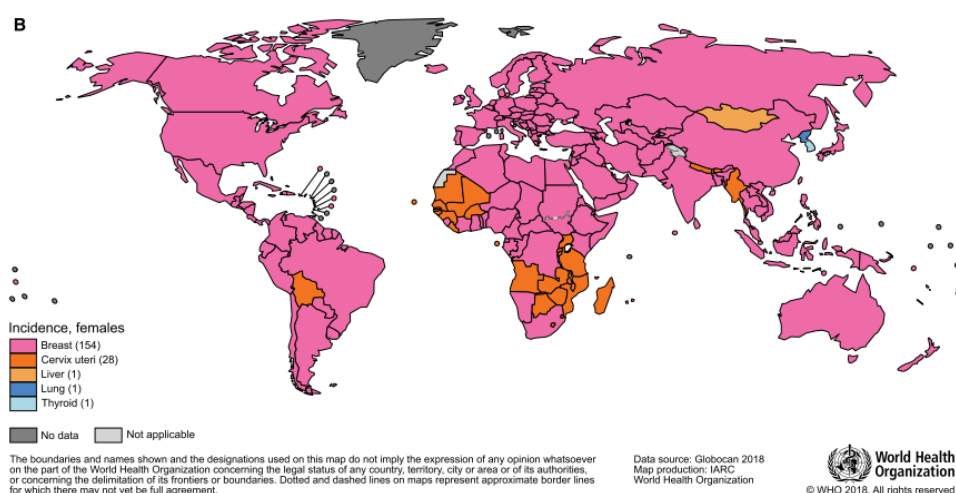


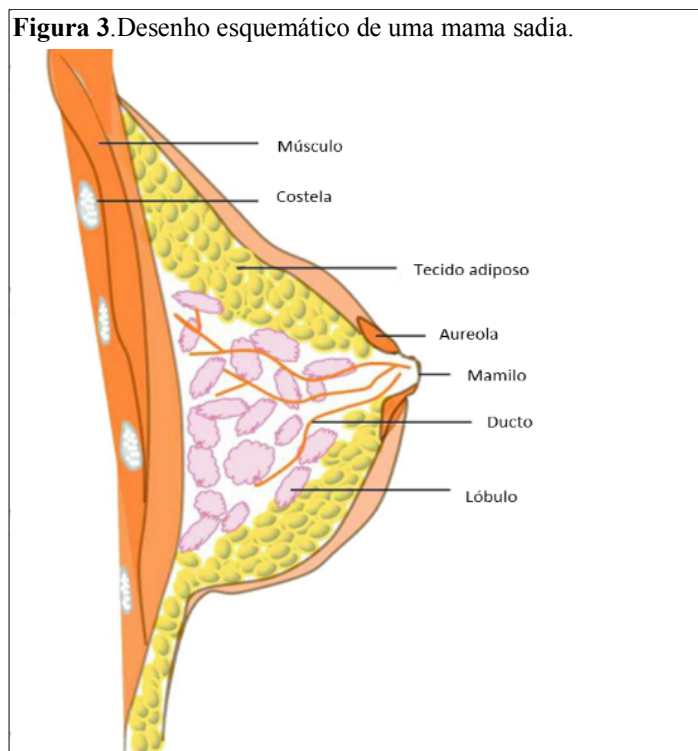
Figura 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não-melanoma* (INCA, 2018).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

2.1.2 Mama normal e neoplásica

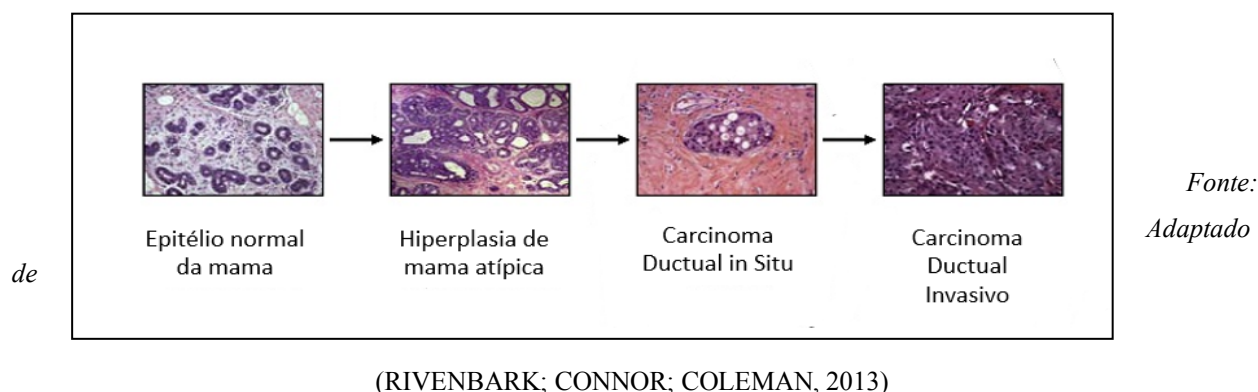
A mama é composta principalmente por tecido adiposo e glandular. Cada mama contém de 15 a 20 lobos (**Figura 3**). Cada lobo é ainda dividido em lóbulos menores, no final dos quais existem minúsculas glândulas, conhecidas como unidades lobulares ductais terminais (TDLUs), em que o leite é produzido em resposta a sinais hormonais (ZHU; NELSON, 2013).



Fonte: Adaptado de ()

O câncer da mama é o resultado de uma falha na capacidade normal de proliferação e diferenciação celular, causada por várias alterações genéticas e epigenéticas que podem acompanhar ou ser necessárias para transições entre os estágios morfológicos ou podem ocorrer entre as células alteradas que compõem as lesões patológicas durante o desenvolvimento e progressão da doença (**Figura 4**). Essas lesões podem evoluir para uma transformação maligna, didaticamente dividida em três etapas: iniciação, promoção e progressão (NAZÁRIO; FACINA; FILASSI, 2015; RIVENBARK; CONNOR; COLEMAN, 2013).

Figura 4. História natural do desenvolvimento do câncer de



O câncer de mama não tem uma causa única, diversos fatores ambientais estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença, tais como estilo de vida (dieta, consumo de álcool e tabagismo), e outras condições individuais (FENGA, 2016). A definição do tipo de tumor pode ser dada, dentre outros, segundo o perfil imuno-histoquímico, que se baseia na avaliação da expressão de receptores hormonais. São utilizados principalmente os Receptores de Estrógeno (RE) e Receptores de Progesterona (RP), do Fator de Crescimento Humano Epidérmico Receptor-2 (HER2) e o índice de proliferação celular pelo Ki-67 (BUI et al., 2010). O câncer de mama se divide em grupos de tumores, identificados assim em cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2+, tipo basal e normal like (**Figura 5**) (MAKKI, 2015). Cada subtipo apresenta diferentes propriedades histopatológicas, que levam a diferentes respostas ao tratamento, e, portanto, devem ter abordagens terapêuticas distintas (DAI et al., 2015). No entanto, em todos os subtipos de câncer de mama, não apenas as vias de sinalização de proliferação e sobrevivência celular estão alteradas, mas também a regulação da reposta imunológica e de outros mecanismos fundamentais para a sobrevivência celular.

Figura 5. Perfil imuno-histoquímico para os subtipos moleculares do câncer de mama

MOLECULAR SUBTYPE				
IMMUNOPROFILE	LUMINAL A	LUMINAL B	HER2/NEU	BASAL-LIKE
ER, PR	ER and/or PR+	ER and/or PR+	ER-, PR-	ER-, PR-
HER2 and others	HER2-Low Ki-67 (<14%)	HER2+ or HER2- Ki-67 = 14% or more	HER2+	HER2- CK5/6 and/or EGFR+

Fonte: Adaptado de (MAKKI, 2015)

Os países em desenvolvimento são os lugares com uma maior prevalência de fatores de risco já conhecidos que estão envolvidos com o câncer de mama tais como : a menstruação (idade

precoce na menarca, idade posterior à menopausa), reprodução (nuliparidade, idade tardia no primeiro parto e menos filhos), ingestão de hormônio exógeno (uso de contraceptivos e terapia de reposição hormonal), nutrição (ingestão de álcool) e antropometria (maior peso, ganho de peso durante a vida adulta e distribuição de gordura corporal); porém o aleitamento materno e atividade física são fatores de proteção conhecidos (BRAY et al., 2018).

O câncer de mama pode ser percebido em fases iniciais, na maioria dos casos, por meio dos seguintes sinais e sintomas: nódulos, fixo e geralmente indolor: é a principal manifestação da doença, estando presente em cerca de 90% dos casos quando o câncer é percebido pela própria mulher; pele da mama avermelhada, retraída ou parecida com casca de laranja; alterações no bico do peito (mamilo); pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço; saída espontânea de líquido anormal pelos mamilos (INCA, 2018).

2.1.3 Diagnóstico do câncer de mama

Para a investigação do câncer de mama, além do exame clínico das mamas, exames de imagem podem ser recomendados, como mamografia, ultrassonografia ou ressonância magnética. A confirmação diagnóstica só é feita, porém, por meio da biópsia, técnica que consiste na retirada de um fragmento do nódulo ou da lesão suspeita por meio de punções (extração por agulha) ou de uma pequena cirurgia. O material retirado é analisado pelo patologista para a definição do diagnóstico (KALAGER et al., 2010)

Além da avaliação histológica tradicional, a caracterização molecular de células tumorais pela medição da expressão gênica relacionada ao câncer (biomarcadores de câncer) tornou-se a base de novos tratamentos para o câncer de mama. Os testes moleculares tornaram-se cada vez mais importante na prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer de mama, e já incluem a expressão de microRNA como informação prognóstica ou resposta ao tratamento (BERSE; LYNCH, 2015; ZOON et al., 2009).

2.1.4 Tratamento do câncer de mama

O tratamento utilizado para o câncer de mama consiste em intervenção cirúrgica para ressecção do tumor (mastectomia radical ou parcial) e abordagem de linfonodos axilares, que pode ser seguida de quimioterapia, radioterapia e/ou terapia hormonal (AYALA et al., 2017).

Este procedimento é acompanhado das terapias convencionais, que são a quimioterapia neoadjuvante e adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante consiste na administração sistêmica dos quimioterápicos antes do procedimento cirúrgico, com objetivo de reduzir o tumor. Já a quimioterapia adjuvante é aquela que é ministrada após a ressecção cirúrgica do tumor com o objetivo de debelar possíveis micro metástases circulantes (MEDIGET TESHOME, M.D. AND KELLY K. HUNT, 2015).

O tratamento quimioterápico afeta não só as células tumorais, mas também as células saudáveis, pois não possui ação específica. Muitas vezes provocam efeitos colaterais graves, incluindo náuseas, vômitos, perda de apetite, fadiga, imunossupressão, anemia e até deficiência da função cognitiva. Além disso, a queda de cabelo secundária à quimioterapia pode levar à ansiedade (ou outros transtornos da saúde mental) e afetar o senso de identidade da paciente. Embora a resposta ao tratamento seja relativamente boa nos estágios iniciais da doença, muitos pacientes sofrem recaídas. Considerando as limitações da terapia tradicional, os esforços de pesquisa estão focados no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que são mais específicas e levam a respostas duradouras (AYALA et al., 2017).

Recentemente, abordagens imunoterapêuticas têm explorado tanto a alta especificidade da resposta imune adaptativa quanto a memória imunológica. A avaliação morfológica de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs) no câncer de mama está ganhando evidência e relevância clínica, descobrindo biomarcadores para os subtipos HER2 + e TNBC. Moléculas imunogênicas podem ser uma ótima solução para estimular a resposta do sistema do paciente contra as células oncogênicas. As terapias com Palbociclib, Ribociclib e Abemaciclib são aprovados para câncer de mama avançado ER + e HER2 +. Já os anticorpos contra a morte celular programada (PD-1), Nivolumab e Pembrolizumab são aprovados para alguns tipos de câncer e muitas outras terapias ainda estão sob avaliação (GODONE et al., 2018).

2.2 Tecido Adiposo e Câncer

O aumento de casos de obesidade no mundo gerou um grande interesse em se observar a biologia do tecido adiposo e seus componentes. O tecido adiposo localiza-se principalmente abaixo da pele e também é encontrado em torno de órgãos internos, na medula óssea, e como já mencionado, é um componente importante da mama humana. Existem dois tipos de tecido

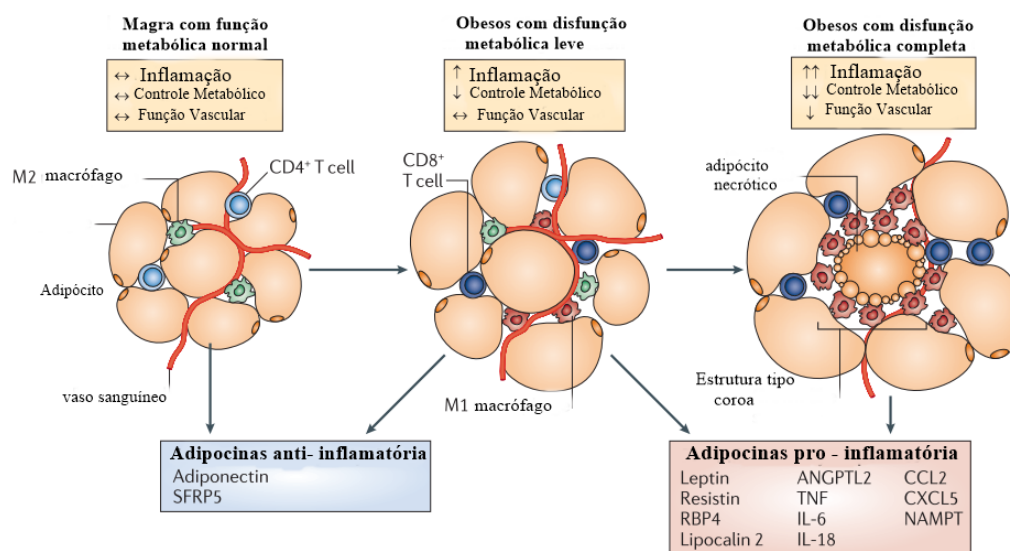
adiposo, tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), que têm funções essencialmente antagônicas. O TAB armazena o excesso de energia como triglicerídeos e o TAM é especializado em dissipar energia através da produção de calor (ZHU; NELSON, 2013).

O tecido adiposo pode influenciar o desenvolvimento do tumor, uma vez que indivíduos obesos têm um risco maior de desenvolver certos tipos de câncer endometrial, esofágico e câncer de células renais (NIEMAN et al., 2013). A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama positivo para receptores hormonais (RH) em mulheres na pós-menopausa. A síntese de estrogênio é catalisada pela aromatase. Após a menopausa, a aromatização periférica de precursores androgênicos no tecido adiposo é amplamente responsável pela síntese de estrogênio. O aumento do risco de desenvolver câncer de mama RH-positivo em mulheres pós-menopausadas e obesas tem sido atribuído a níveis aumentados de estradiol circulante relacionados tanto ao aumento de tecido adiposo quanto à expressão elevada de aromatase no tecido adiposo subcutâneo. Além de seu impacto no risco de câncer de mama, a obesidade tem sido reconhecida como um fator de mau prognóstico entre os sobreviventes de câncer de mama (MORRIS et al., 2011).

Na obesidade, os depósitos de tecido adiposo hipertrofiado são caracterizados por um estado de inflamação de baixo grau. Neste estado ativado, os adipócitos geram grandes quantidades de fatores pró-inflamatórios como leptina, resistina, proteína ligadora de retinol 4 (RBP4), lipocalina 2, proteína tipo angiopoietina 2 (ANGPTL2), tumor fator de necrose (TNF), interleucina-6 (IL-6), IL-18, ligante de quimiocina-CC 2 (CCL2), ligante de quimiocinas CXC 5 (CXCL5) e nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT) que são conhecidas por promoverem o desenvolvimento de tumores (**Figura 6**) (NIEMAN et al., 2013; OUCHI et al., 2011). À medida que a obesidade se desenvolve, os adipócitos sofrem hipertrofia devido ao aumento do armazenamento de triglicérides no tecido adiposo. A inflamação visceral do TAB, manifestada como estrutura tipo coroa (CLS), está associada ao aumento dos níveis de mediadores pró-inflamatórios que promovem o desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes, ambos predizem pior sobrevida para pacientes com câncer de mama. A presença de inflamação da mama é associada à ativação do NF- κ B, um fator de transcrição que ativa a expressão de mediadores pró-inflamatórios, e o aumento dos níveis de aromatase, a enzima que é responsável da biossíntese de estrogênio. Assim, a inflamação da mama é indicador de inflamação difusa do

TAB, e ocorre em associação com várias alterações no nível tecidual que podem conferir pior prognóstico para pacientes com câncer de mama.(IYENGAR et al., 2016).

Figura 6. Modulação fenotípica do tecido adiposo



Fonte: Adaptado de (OUCHI et al., 2011)

2.2.1 Sirtuína 1 e tecido adiposo

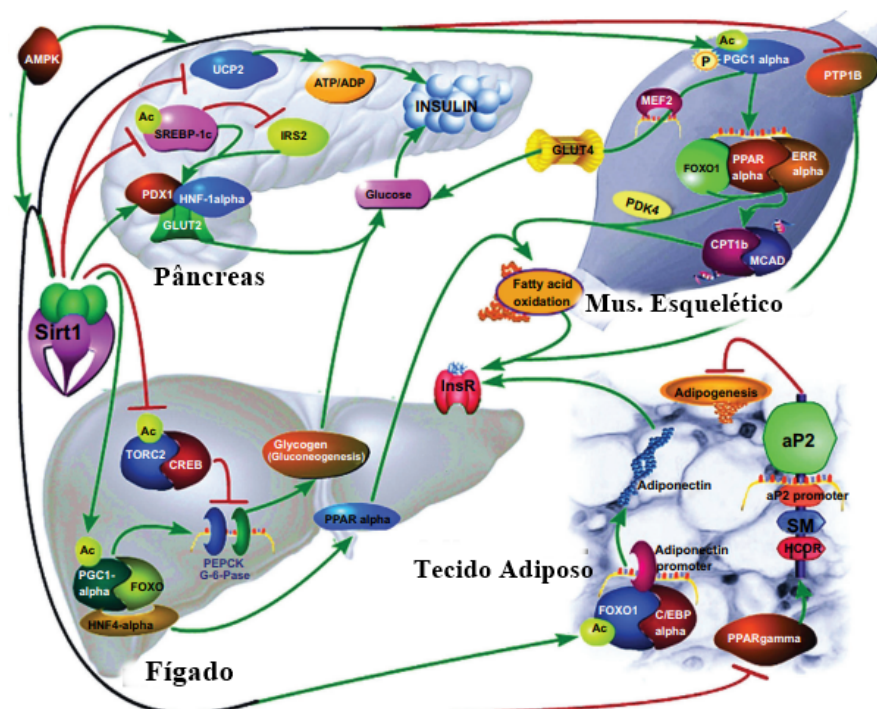
As sirtuínas são amplamente distribuídas por toda a célula e funcionam para regular uma variedade de processos fisiológicos normais. Elas estão envolvidas na proliferação celular, inflamação e metabolismo, incluindo produção de ATP, secreção de insulina, ciclo da uréia, defesa celular e diferenciação e metabolismo dos adipócitos. Estudos também sugerem que a SIRT1 dos adipócitos controla a homeostase sistêmica da glicose e a sensibilidade à insulina via a conversa cruzada com macrófagos residentes no tecido adiposo (HUI et al., 2017; PICARD et al., 2004)

A SIRT1 é um membro da família de histona desacetilases de classe III (HDACs) que são homólogos humanos do regulador de informação silencioso da levedura 2 (sir2). Esta família de sirtuínas apresenta sete isoformas, dos quais a SIRT1 é a mais amplamente estudada (CHEN; YUAN; SU, 2013; FANG; NICHOLL, 2011). Ela está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos, tais como metabolismo, e sobrevivência celular, devido à sua capacidade de desacetilar algumas histonas e alguns substratos não-histona. Várias evidências indicaram que a

SIRT1 é crucial na fisiopatologia da doença metabólica, distúrbios neurodegenerativos, câncer e envelhecimento. A SIRT1 tornou-se, portanto, um alvo importante para estratégias inovadoras de tratamento molecular (ZSCHOERNIG; MAHLKNECHT, 2008).

A homeostase metabólica é controlada pela desacetilação mediada por SIRT1 e, consequente ativação do co-ativador do PPAR γ que estimula a atividade mitocondrial e pode levar ao aumento do metabolismo da glicose, que por sua vez aumenta a sensibilidade à insulina (ZSCHOERNIG; MAHLKNECHT, 2008). Nos adipócitos, a SIRT1 também aumenta a interação entre fatores de transcrição que mediam a ativação do promotor da adiponectina, que está envolvida na sensibilização do receptor de insulina (InsR). Nos adipócitos ocorre uma inibição da PPAR γ pela SIRT1, estimulando o complexo NcoR e SMRT levando à ativação do promotor da proteína de ligação ao tecido adiposo (aP2), auxiliando na supressão da diferenciação do tecido adiposo (**Figura 7**) (ADITYA et al., 2017).

Figura 7. Relação entre SIRT1 e PPAR γ em vários locais no organismo, observasse principalmente a interação deles no tecido adiposo. (Setas verdes indicam ativação, setas vermelhas indicam inibição e linhas pretas indicam ação mista da mesma fonte)



Fonte: Adaptado de (ADITYA et al., 2017)

O papel da SIRT1 na tumorigênese ainda não está bem definido, mas tem sido observado que ela pode desempenhar um papel tanto na promoção quanto supressão do câncer. Essa dualidade parece ser dependente da condição do tecido, da distribuição temporal e espacial dos fatores relacionados na regulação da SIRT1 (CHEN; YUAN; SU, 2013; FANG; NICHOLL, 2011). No carcinoma ductal invasivo, a SIRT1 está altamente expressa em comparação com tecido normal adjacente, e regula positivamente a expressão de aromatase, uma enzima importante na biossíntese de estrogênio no câncer de mama. Desta forma, a SIRT1 é essencial para a sinalização oncogênica do receptor de estrogênio/estrogênio α (ER α) no câncer de mama, e sua inativação suprime o crescimento celular e o desenvolvimento de tumores induzidos por estrogênio/ER α e induz a apoptose. A expressão da SIRT1 também foi associada com metástase à distância e mau prognóstico, uma vez que a SIRT1 pode promover a sobrevivência celular após dano ao DNA por meio da inativação da via da p53 e inativação do gene supressor tumoral hipermetilado em câncer 1 (HIC1) via hipermetilação do DNA (CHEN; YUAN; SU, 2013).

A regulação positiva de SIRT1 também está associada à diminuição de miR-200a em amostras de câncer de mama, que têm como alvo as três regiões primárias não-traduzidas do RNA mensageiro SIRT1 (mRNA) e promovem a transição epitelial-mesenquimal (EMT) em células epiteliais mamárias. Além disso, a SIRT1 foi observada associada com a ativação de proteínas ligadas à quimiorresistência ao tamoxifeno (CHEN; YUAN; SU, 2013).

2.2.2 Receptores ativados por proliferação de peroxissomo gamma (PPAR γ) no tecido adiposo

O papel do PPAR γ tem sido estudado em diferentes tipos de câncer, uma vez que esta molécula está diretamente envolvida na adipogênese e, conseqüentemente, pode influenciar nos processos de obesidade, inflamação e pode estar associado a diversos tipos de câncer (**Figura 8**). Embora todas as isoformas do Receptores ativados por proliferação de peroxissomo (PPAR) estejam associadas com síndromes metabólicas, o PPAR γ parece estar envolvido principalmente na regulação da tumorigênese via ativação de diferentes vias. Dessa modo, a modulação das vias de sinalização do PPAR poderia ser uma nova estratégia para inibir a carcinogênese e a progressão tumoral (FANALE; AMODEO; CARUSO, 2017).

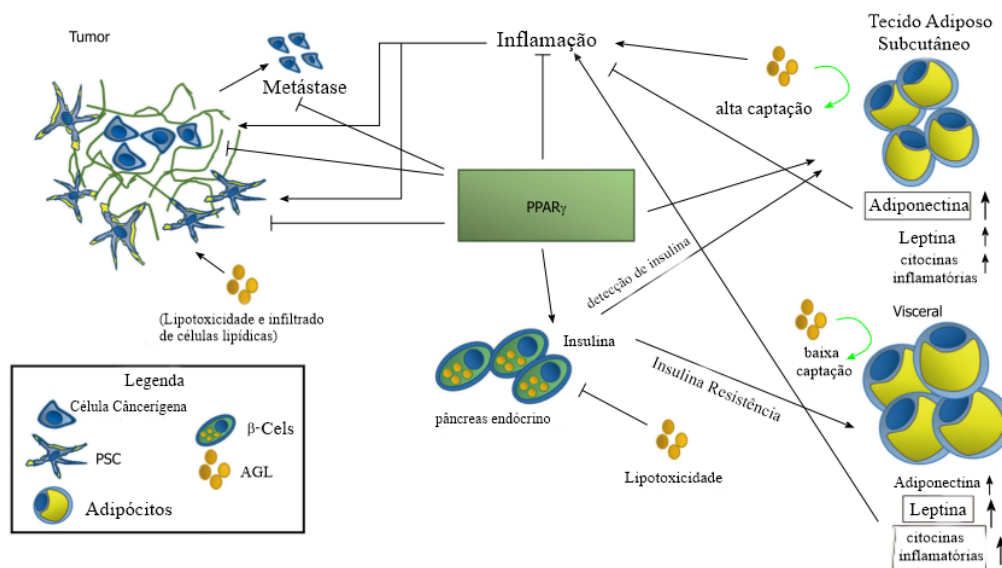
Receptores ativados por proliferação de peroxissoma (PPARs) são um grupo de receptores de hormônios nucleares ativados por ligantes (NRs), existentes na superfamília de

receptores de esteróides, que inclui os receptores para hormônios tireoidianos, retinóides, 1,25-di-hidroxivitamina D3 e hormônios esteroides (VITALE et al., 2016). O PPAR também pode ser ativado por ligantes sintéticos, tais como tiazolidinedionas (TZDs), incluindo ciglitazona, rosiglitazona, troglitazona e pioglitazona (FANALE; AMODEO; CARUSO, 2017). Um estudo mostra evidências dos efeitos antitumorais de drogas que utilizam a via do PPAR γ , uma vez que ele parece estar regulado em várias linhas de câncer humano (LU et al., 2018).

Existem duas isoformas do PPAR γ proteína que resulta de locais distintos de iniciação transcricional no mesmo gene: PPAR γ 1 e PPAR γ 2. O PPAR γ 2 é predominantemente expresso em tecidos adiposos, enquanto a expressão de PPAR γ 1 foi detectado em muitos tecidos de origem epitelial, como o intestino, pulmão, mama, cólon e próstata. O PPAR γ atua como um regulador crítico da homeostase de lipídios e glicose, diferenciação de adipócitos e eventos de sinalização de insulina intracelular (TANG et al., 2015; ZAYTSEVA et al., 2011).

Como prova disso, dados recentes sugerem que os ligantes *PPAR* γ têm um efeito antitumorigênico no câncer de próstata como resultado de efeitos antiproliferativos e de prodiferenciação (PARK et al., 2015). A ativação do PPAR γ pode aumentar a secreção e a produção de insulina nas células β e pode aumentar a sensibilidade à insulina no tecido periférico. O *PPAR* γ induz a diferenciação de pré-adipócitos em novos adipócitos pequenos que são mais sensíveis à insulina e produzem menor quantidade de adipocinas inflamatórias. Logo, o PPAR γ pode direta e indiretamente (modular os níveis de adiponectina e leptina) inibir a inflamação alterando o nível de adiponectina e leptina (POLVANI, 2016).

Figura 8. Efeitos do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma no diabetes, obesidade e adenocarcinoma ductal pancreático. AGL: Ácidos graxos livres; PPAR γ : Receptor- γ ativado por proliferador de peroxissoma; PSC: Células estreladas pancreáticas.



Fonte: Adaptado de (POLVANI, 2016)

Uma série de investigações, explora a hipótese de que a mutação do gene PPAR γ pode influenciar no desenvolvimento e na progressão da malignidade. Porém existe várias controvérsias sobre esse polimorfismo, pois alguns estudos observam o polimorfismo no gene PPAR γ sendo um fator de proteção contra câncer colorretal, entretanto outros estudos mostram que polimorfismos nesse gene estão associado ao risco de câncer (KOPP et al., 2013; PARK et al., 2015; TANG et al., 2015). Por isso faz se necessário a análise desse gene em câncer de mama, levando em consideração os subtipos de câncer.

Doenças metabólicas, como obesidade e diabetes tipo 2, são frequentemente acompanhadas por inflamação crônica e disfunção do tecido adiposo. E, como visto o tecido adiposo desempenha um papel central na manutenção da homeostase metabólica em condições normais. Nesse sentido o tecido adiposo obeso é caracterizado por hipertrofia e hiperplasia aumentada de adipócitos, resultando em infiltração de células inflamatórias e ativação da rede de citocinas (KAWASAKI et al., 2012; MAKKI; FROGUEL; WOLOWCZUK, 2013).

2.2.3 Interleucina 18 e tecido adiposo

A interação entre o câncer e o sistema imune tem sido estudada por vários pesquisadores ao decorrer do tempo. Novas descobertas sobre o sistema imunológico e os mecanismos pelos quais os tumores evitam o controle imunológico levaram ao desenvolvimento de estratégias inovadoras no âmbito terapêutico, que estão entre os assuntos mais comentados desta década (MUENST et al., 2016).

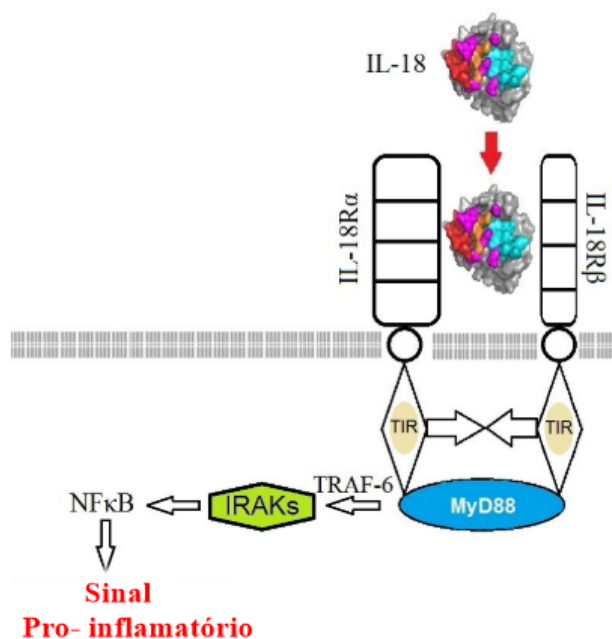
A IL-18 é uma citocina marginalmente pró-inflamatória pertencente à família IL-1. Esta molécula é expressa como pró-IL-18, uma forma biologicamente inativa de 24kDa e transformada na forma ativa de 18kDa. Ela é uma citocina que foi inicialmente identificada como um fator indutor de interferon IFN- γ , uma citocina pleiotrópica desempenha um papel muito importante tanto no sistema imune relacionados ao desenvolvimento do tumor e na indução de respostas imunes antitumorais (M. CANDEIAS; S. GAIPL, 2015). Estudos mostraram um aumento da expressão de IL18 no tecido adiposo na obesidade, assim como do receptor de IL18 (IL-18R), o que pode ser associado com inflamação do tecido e resistência à insulina (AHMAD et al., 2017; BRUUN et al., 2007). Em relação aos adipócitos brancos, eles foram examinados como uma fonte potencial de IL-18, cujos níveis circulantes estão aumentados na obesidade. A expressão de IL-18 foi evidente no tecido adiposo subcutâneo e visceral humano, tendo ocorrido em adipócitos maduros e na fração estromal-vascular (WOOD et al., 2005).

O sistema imunológico é reconhecido como um supressor de tumor extrínseco que pode eliminar células normais que se transformaram em células cancerígenas. As principais células imunes que são responsáveis pela eliminação das células do câncer são os linfócitos T citotóxicos e as células natural *killer* (NK). A infiltração de linfócitos T CD8+ está associada a melhores desfechos gerais do paciente, independente de outros fatores prognósticos, como grau tumoral, estágio linfonodal, tamanho, invasão vascular e status HER2 em relação ao câncer de mama (JIANG; SHAPIRO, 2014).

A IL-18 é produzida por uma variedade de células e tecidos, desde células imunes até células tumorais. Além de seu papel na indução de IFN- γ , a IL-18 aumenta a citotoxicidade de células NK e a proliferação de células T ativadas; estimula a secreção de fatores pró-angiogênicos incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e trombospondina (TSP)-1. A ativação completa das células pela IL-18 requer a interação entre o receptor da IL-18Ra da interleucina e o co-receptor da cadeia beta da IL-18 (IL-18R β) e forma um complexo

heterotrimérico de alta afinidade pelo IL-18R β juntamente com o IL-18R α , recrutando as proteínas IRAK e TRAF, o que leva à ativação do Nf- κ B e Ap-1 (**Figura 9**) (PALMA et al., 2013; WAWROCKI et al., 2016; YANG et al., 2015).

Figura 9. Formação de um complexo heterotrimérico de alta afinidade pela IL18, o Receptor de IL18 beta e o Receptor de IL18 alfa.



Fonte: Adaptado de (WAWROCKI et al., 2016)

Estímulos bacterianos e inflamatórios induzem a produção de IL-18 por células imunes e não imunes em vários órgãos / tecidos metabólicos, como cérebro, fígado, músculo esquelético e, especialmente, tecido adiposo (OSBORN et al., 2008). Pesquisas mostram que em alguns cânceres, como melanoma e câncer de pâncreas, altos níveis séricos de IL-18 estão correlacionados com mau prognóstico em múltiplos tipos de câncer e, embora o mecanismo de ação permaneça obscuro, estudos demonstraram que a IL-18 derivada de tumor não só provoca expansão de células NK imuno-ablativas (subgrupos imunossupressores), mas também provoca a morte prematura de células NK (CARBONE et al., 2009; PARK et al., 2001, 2017).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População de Estudo

O presente estudo de coorte transversal, realizado com 57 mulheres atendidas no Hospital Barão de Lucena- Recife (PE), com idades entre 35 e 65 anos, diagnosticadas com de câncer de mama. As amostras de tecido neoplásico foram obtidas durante o procedimento cirúrgico. As pacientes foram subdivididas em quatro grupos, de acordo com o tipo histológico de câncer de mama: HER2+ (06 pacientes), triplo negativo (07 pacientes) e luminal (44 pacientes). Um total de 10 pacientes sadios foram incluídos na pesquisa, com tecido mamário coletado durante o procedimento estético de redução de mama.

Fatores como etilismo, tabagismo, paridade, histórico de câncer familiar, menopausa, tipo de quimioterapia, e obesidade foram categorizadas de forma binária. A obesidade, quando disponíveis os valores de índice de massa corpórea (IMC), foi categorizada em níveis de 1 a 3 (NEUHOUSER et al., 2015; SHIYANBOLA et al., 2017). Os dados clínicos foram coletados do prontuário das pacientes. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco - Plataforma Brasil (Ministério da Saúde) CAAE: 47869315 0 00005208.

3.2 Coleta de Amostras

Amostras do tecido tumoral foram coletadas e mantidas em Trizol (Invitrogen, USA) para garantia de preservação do RNA. O material biológico foi mantido em refrigeração a -80°C até o momento da realização das análises moleculares.

3.3 Tratamento da amostra

O RNA genômico foi extraído do tecido fresco seguindo o protocolo do Trizol (Invitrogen, USA). Fragmentos de 50–100 mg tecido, que foram mantidos em 1 mL de TRizol, foram centrifugados por 5 minutos a 12.000×g a 4°C. Após a centrifugação, o material foi incubado por 5 minutos para a dissociação de complexo de nucleoproteínas, e posteriormente foi adicionado 200µL de clorofórmio para lise celular. O material foi incubado por 2–3 minutos e então centrifugado por 15 minutos a 12,000×g a 4°C. A fase aquosa superior contendo o RNA foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado 500µL de isopropanol. O material foi

incubado por 10 minutos e centrifugado a $12.000\times g$ a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 1ml de álcool 75%, e centrifugado por 5 minutos a $7.500\times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado, seco e ressuspendido com 50 μL de água ultrapura. O material eluído foi armazenado a -80°C até a análise, quando foi quantificado em NanoDrop ND-1000 (NanoDroptecnologias; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A síntese de cDNA foi realizada com o kit QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen, USA), utilizando 2 μL de gDNA Wipeout Buffer, 7x mais 12 μL da amostra de RNA, incubar a 42°C por 2 minutos e imediatamente após a incubação, colocar o mix no gelo. Na segunda etapa utilizamos 1 μL de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 μL de Quantiscript RT Buffer, 5x, 1 μL de RT primer mix e 14 μL da mistura de RNA e gDNA Wipeout Buffer 7x. As condições de ciclagem para a segunda etapa foram: 42°C por 15 minutos, 95°C por 3 minutos. A etapa de ciclagem foi realizada no Applied Biosystems™ Veriti™. Todas as amostras de cDNA foram quantificadas em NanoDrop® – 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE) antes de serem realizadas as análises da qPCR (PCR quantitativo).

3.4 Análise de expressão gênica

A análise por PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOne Plus™ (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados foram fabricados e fornecidos pela IDT (Integrated DNA Technologies) são eles, *PPAR γ* (Hs.PT.58.153788), *IL18* (Hs.PT.58.25675872) e *SIRT1* (Hs.PT.58.40790669). Os *primers* do gene de referência (beta-actina) foram sintetizados pela Exxtend, a partir das sequências fornecidas (*Fw*: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3' e *Rv*: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'). Para a reação de qPCR dos genes alvo foi utilizado o kit SyBr® Green Master Mix (Promega, USA) com volume final da reação de 10 μL , contendo: 5 μL de SYBR, 0,1 μL do *primer*, 0,1 μL de CXR (Carboxy-X-Rhodamine), 3,8 μL de água e 1 μL de cDNA (100ng). Para a análise do gene de referência β -actina, foi utilizado o volume final da reação de 10 μL : 5 μL de SYBR, 0,1 μL do *primer forward* e 0,1 μL do *primer reverse*, 0,1 μL de CXR, 3,7 μL de água e 1 μL de cDNA (100ng). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95°C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos, 60°C por 30 segundos. A curva de *melting* foi realizada no final da reação em um estágio de $60-95^{\circ}\text{C}$.

As curvas de dissociação foram geradas para garantir que apenas um produto foi amplificado (*melting curve*). A expressão gênica foi analisada através dos valores de ΔC_t ($C_{t_{\text{alvo}}} - C_{t_{\beta\text{-actina}}}$), no qual valores mais altos indicam menor expressão gênica.

3.5 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste exato de Fisher foi utilizado para dados categóricos e, Mann-Whitney foi utilizado para dados numéricos. O nível de significância de todos os testes foi definido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

A mediana da idade do diagnóstico do câncer de mama nas mulheres analisadas foi de 55 anos, sendo que a idade mínima foi de 28 anos e a máxima de 100 anos. Foi observado que na faixa etária de mulheres >40anos é o período que a mulher começa a apresentar diferença hormonal, então nossas pacientes foram estratificadas em dois grupos ≤ 40 anos e > 40 anos. Destas, 48 pacientes (84,21%) tinham 40 anos ou mais, enquanto 08 pacientes (14,03%) apresentavam menos de 40 anos (**Tabela 1**). Uma paciente não informou a idade.

Dentre as pacientes pesquisadas, 89,4% já tinham filhos, 19,2% apresentavam hábito tabagistas e 12,5% eram etilistas. Em relação à obesidade, 36,8% das pacientes eram consideradas obesas. Quanto à etnia, aquelas autodeclaradas pardas correspondiam a 61,40% das pacientes quanto a negra, branca e indígenas correspondiam 10,52%, 22,80% e 1,75% respectivamente. Com relação as pacientes que já estavam no período da menopausa 49,12% das pacientes se encontravam nesse período, enquanto 42,10% e 8,78% não estavam no período da menopausa e não responderam, respectivamente.

Em relação aos subtipos e a quimioterapia, o subtipo Luminal foi o mais prevalente entre as pacientes (77,2%) e a Quimioterapia Adjuvante (QtAdj) foi a terapia mais usadas (73,6%) nas pacientes analisadas.

Tabela 1. Caracterização das pacientes com câncer de mama envolvidas no estudo.

Variáveis	Casos	
	N	%
Idade		
≤ 40	8	14,03
> 40	48	84,21
ND	1	1,75
Etilista		
Sim	7	12,50
Não	44	78,57

ND	5	8,93
Etnia		
Branca	13	22,80
Parda	35	61,40
Negra	6	10,52
Indígena	1	1,75
ND	2	3,5
Obesidade		
Sim	21	36,84
Não	27	47,36
ND	9	15,78
Menopausa		
Sim	28	49,12
Não	24	42,10
ND	5	8,78
Tabagismo		
Sim	11	19,29
Não	40	70,17
ND	6	10,52
Quimioterapia		
Qt Adjuvante	42	73,68
Qt Neoadjuvante	14	24,56
ND	1	1,75
Histórico de câncer familiar		
Sim	42	73,68
Não	14	24,56
ND	1	1,75
Paridade		
Sim	51	89,47
Não	4	7,02
ND	2	3,51

Subtipos

Luminal	44	77,20
HER2+	6	10,52
Triplo negativo	7	12,28

*Não Disponível (ND)

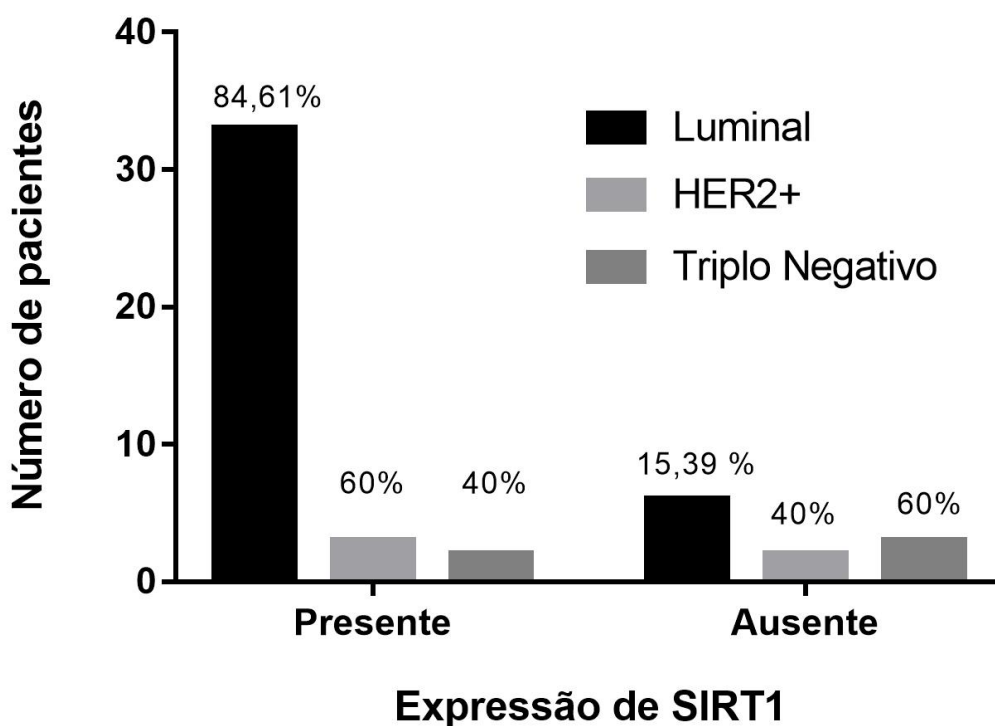
Fonte: Dados da pesquisa

Após a caracterização das pacientes, o presente estudo avaliou a expressão dos três genes em amostras de tecido fresco de pacientes com câncer de mama e pacientes controles, sem câncer de mama, na qual foram avaliados um total de 67 amostras teciduais, sendo de 57 câncer de mama e 10 de pacientes controle.

4.2. Análise de expressão do gene *SIRT1* em pacientes com câncer de mama

Um total de 49 pacientes com câncer de mama foram caracterizadas para o gene *SIRT1*, uma vez que não foi possível avaliar a expressão. O gene *SIRT1* apresentou-se expresso em todos os subgrupos, tendo a maior expressão no grupo de pacientes luminais (84,61%) (**Figura 10**). No grupo de pacientes triplo negativo, apenas 40% apresentaram expressão de *SIRT1*.

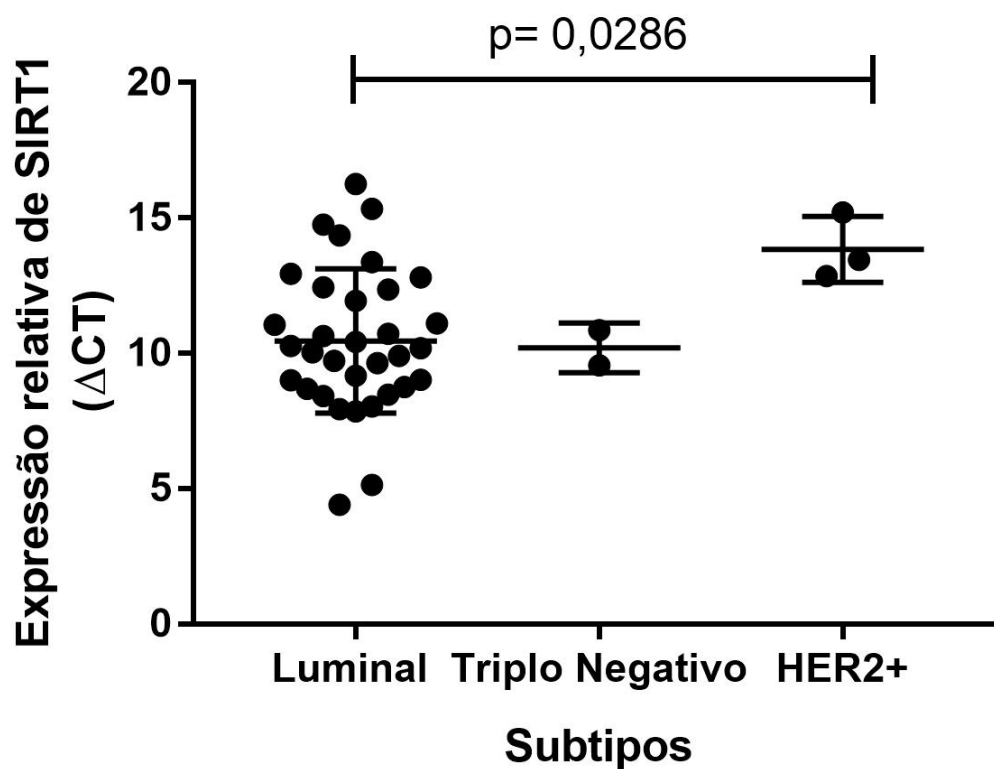
Figura 10. Expressão do gene *SIRT1* no grupo de 49 pacientes com câncer de mama.



Os maiores níveis de expressão relativa de *SIRT1* foram observados nos pacientes do subtipo Luminal. Os níveis de expressão relativa apresentaram significância no grupo luminal comparado com o grupo HER2+ ($p=0,0286$) (**Figura 11**).

O grupo de pacientes triplo negativo não apresentou significância em relação aos demais grupos devido ao número reduzido de pacientes que apresentaram expressão.

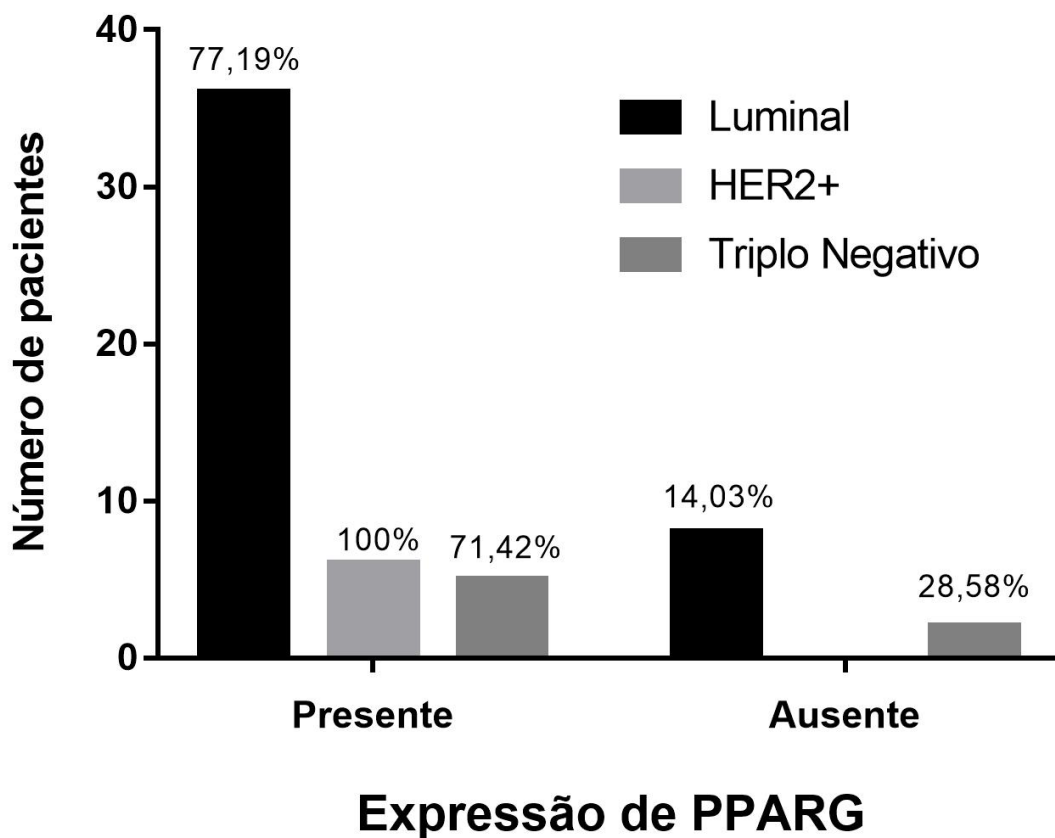
Figura 11. Expressão Relativa (ΔCT) de SIRT1 nos subtipos de câncer de mama



4.3. Análise de expressão do gene *PPAR γ* em pacientes com câncer de mama

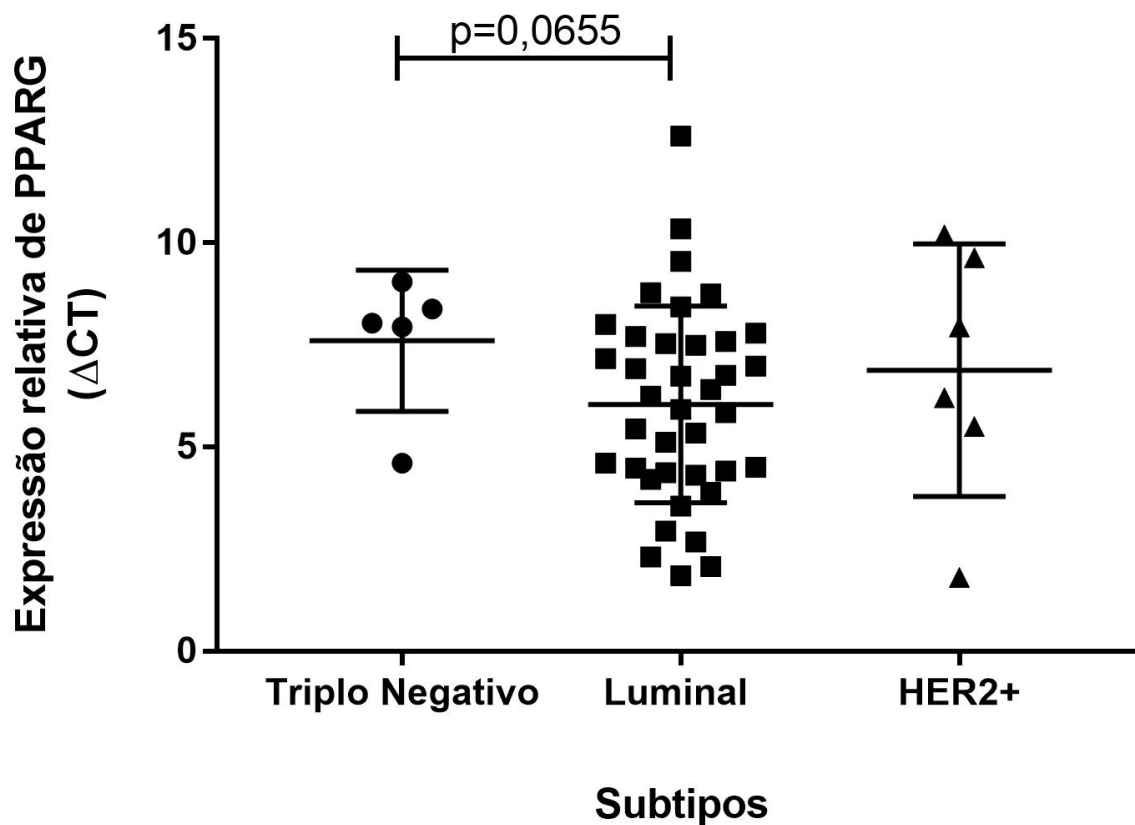
Foi observado que a expressão do *PPAR γ* estava significativamente aumentada no tecido tumoral de pacientes luminais (82,60%), quando comparada ao subtipo triplo negativo (**Figura 12**). Em relação ao subtipo HER2+ todas as pacientes desse grupo expressaram *PPAR γ* .

Figura 12. Expressão do gene *PPAR γ* em pacientes com câncer de mama



Em relação à expressão relativa do *PPARG* (Δ CT), observou-se valores de p próximos da significância entre o grupo de Triplo negativo e o grupo Luminal. Os pacientes com subtipo triplo negativo apresentaram baixa expressão de *PPARG* ou não expressaram o gene. Porém o reduzido número de pacientes deste grupo não permite uma análise estatística mais precisa (**Figura 13**).

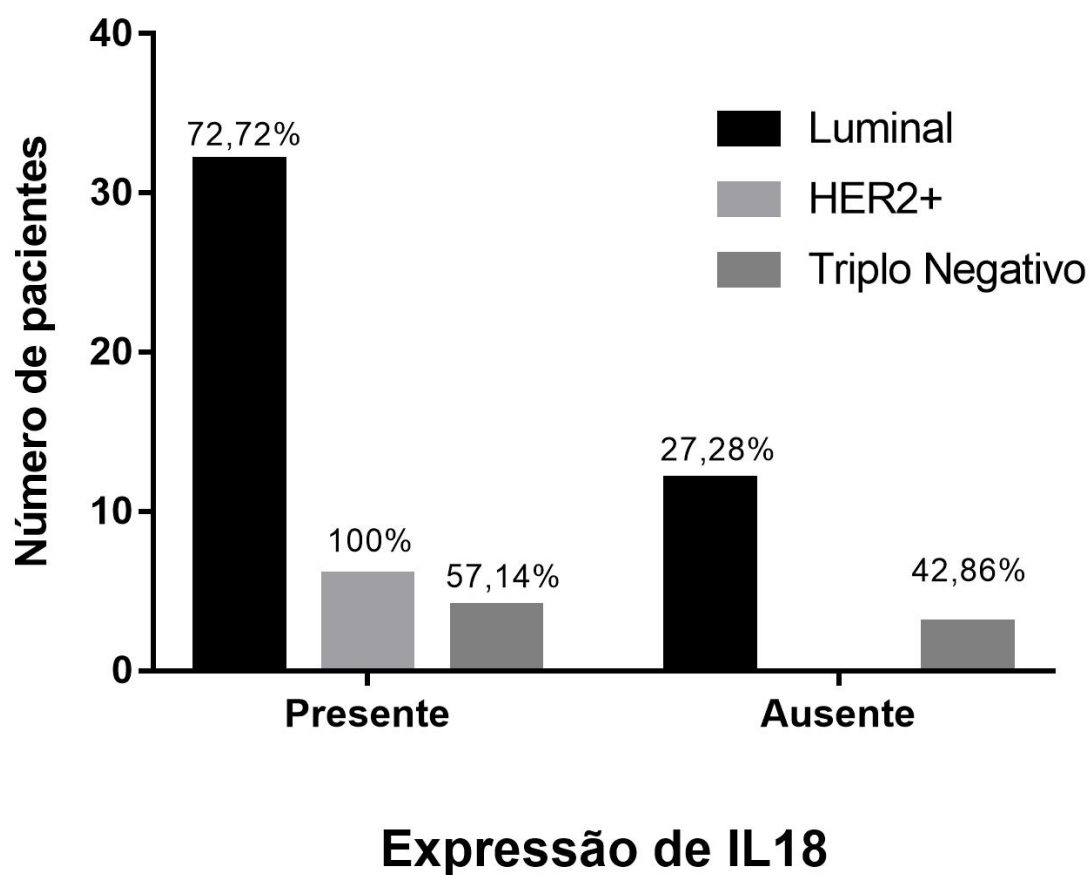
Figura 13. Expressão relativa do gene *PPARG* (Δ CT) em pacientes com câncer de mama.



4.4. Análises de expressão do gene *IL18* em câncer mama

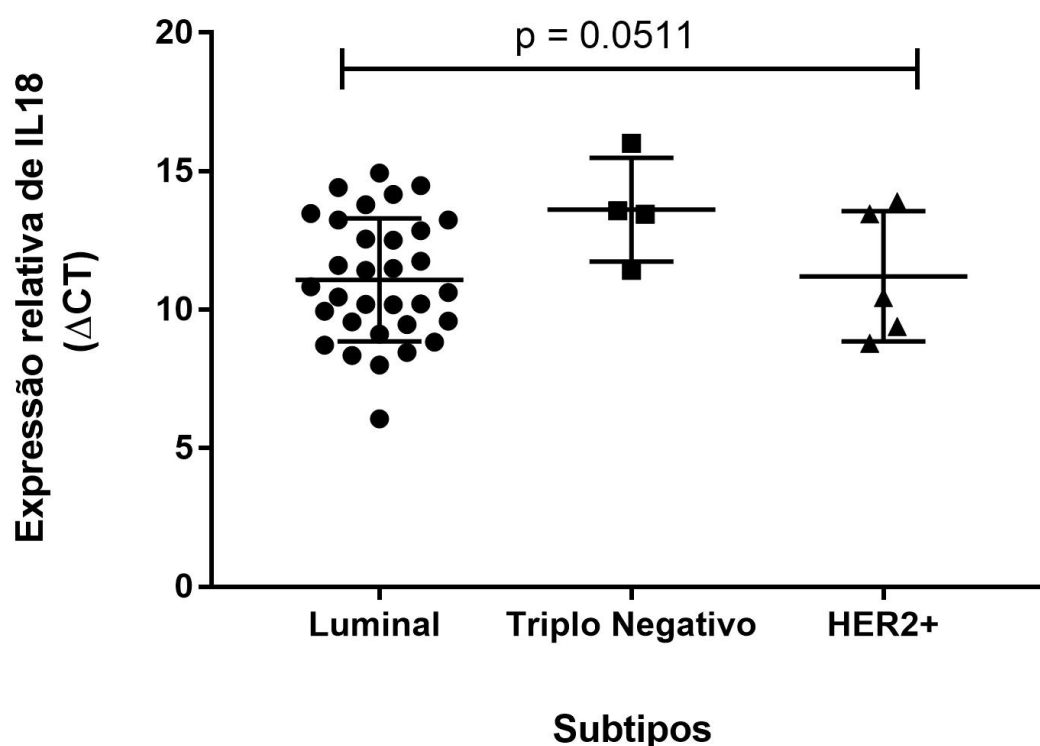
Em relação aos subtipos, o grupo HER2+ foi o único em que todos os pacientes expressaram *IL18*. Também foi observado que a maioria dos pacientes que pertenciam ao grupo luminal expressaram este gene (72,72%), enquanto o grupo triplo negativo apresentou o menor percentual (57,14%) (**Figura 14**).

Figura 14. Expressão do gene *IL18* em pacientes com câncer de mama.



Em relação a expressão relativa de *IL18* em pacientes com câncer de mama, observou-se que os pacientes do grupo triplo negativo apresentaram os menores níveis de expressão relativa. A relação entre o grupo luminal e o grupo HER2+ apresentaram perfis semelhantes (**Figura 15**).

Figura 15. Expressão Relativa (Δ CT) do gene *IL18* em pacientes com câncer de mama.



4.5 Análise de correlação entre os genes

A análise de regressão linear do Δ CTs revelou que a expressão destes genes apresenta um comportamento diferente entre si. Desta forma, é possível afirmar que há aumento discreto da expressão de *PPARG* quando há expressão aumentada de *SIRT1* (**Figura 16**), como também que há expressão aumento discreto de *IL18* quando há aumento de *SIRT1* (**Figura 17**).

Figura 16. Regressão linear entre os Δ CTs dos genes *PPARG* e *SIRT1*.

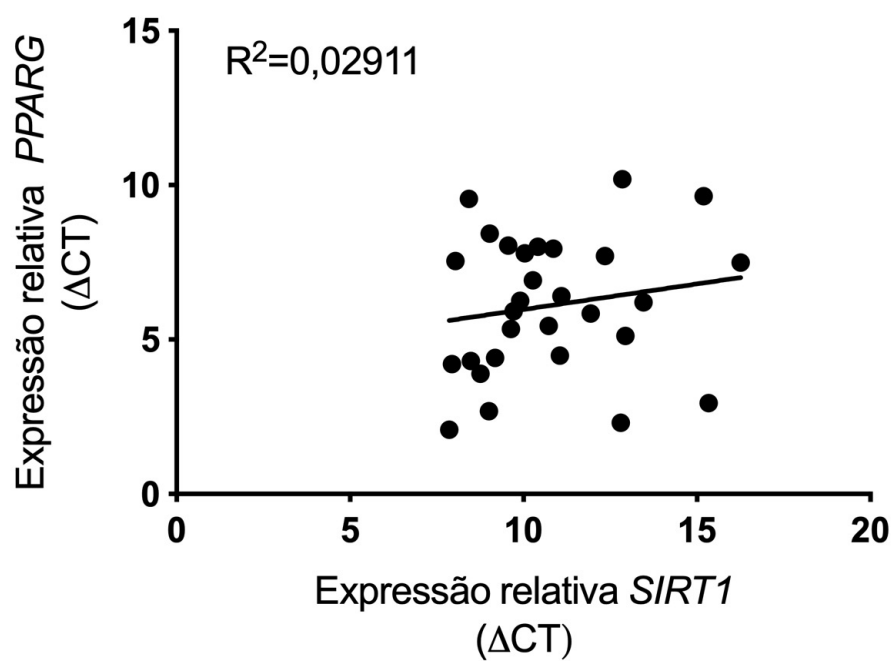
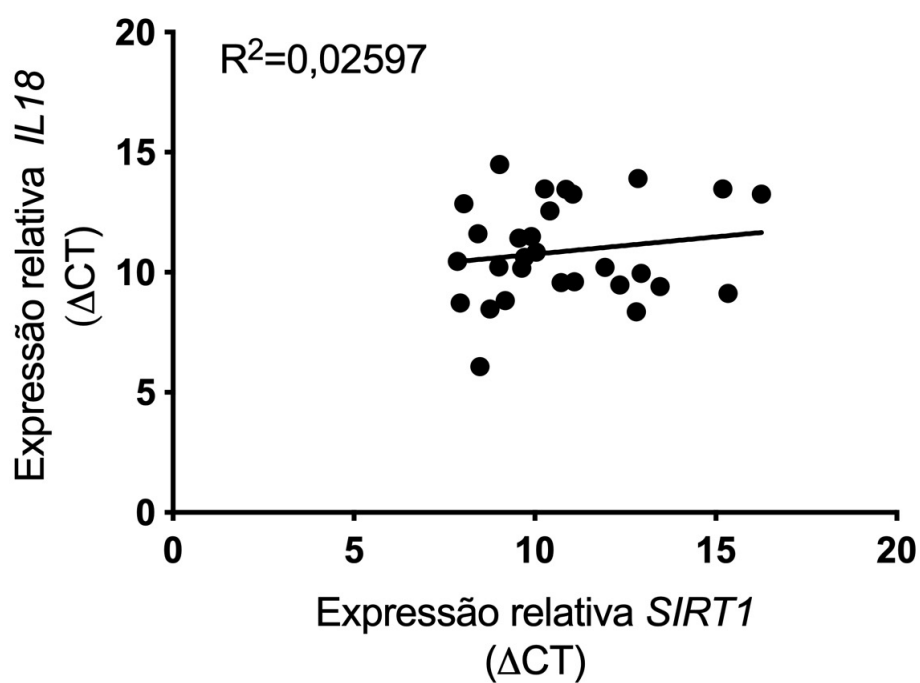
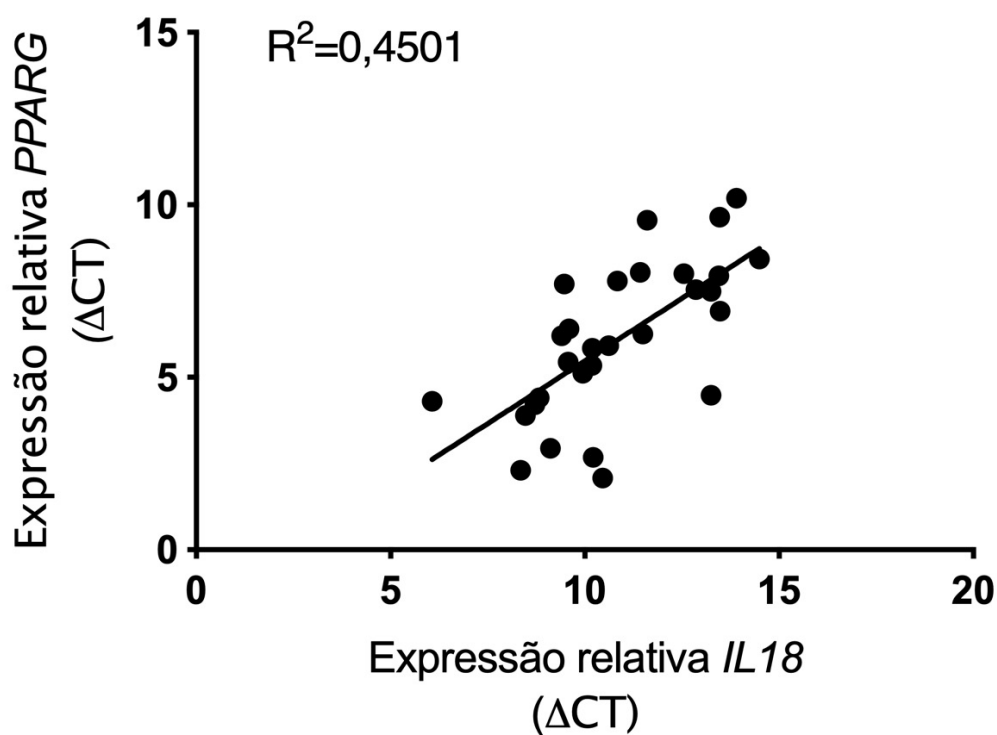


Figura 17. Regressão linear entre os Δ CTs dos genes *SIRT1* e *IL18*.



No entanto, existe uma correlação clara entre a expressão de *PPARG* e *IL18*, indicando que o aumento da expressão de *PPARG* pode levar ao aumento dos níveis de expressão de *IL18* (Figura 18).

Figura 18. Regressão linear entre os Δ CTs dos genes *PPARG* e *IL18*.



Após a análise da expressão de todas as pacientes observou-se que nenhuma das amostras controles expressou para nenhum dos 3 genes.

Dentro da variável obesidade, as pacientes foram estratificadas de acordo com o grau para a análise de expressão dos 3 genes estudados. O maior percentual de expressão dos genes *SIRT1*,

PPARG e *IL18* foram encontrados em pacientes com grau de obesidade I, 75%, 60% e 66,6% respectivamente. Nenhuma das pacientes foi classificada como grau de obesidade III.

Pacientes que fizeram quimioterapia adjuvante tiveram uma maior expressão de *PPARG* (66%), enquanto o percentual de expressão de *SIRT1* (57,1%) e *IL18* (57,1%) foi similar neste grupo. No entanto, não observamos diferença estatística entre os tipos de quimioterapia ou em relação à expressão dos três genes estudados.

5. DISCUSSÃO

Como foi mostrado acima a mediana de idade das pacientes analisadas foi de 55 anos. Estudos corroboram com nossos achados e afirmam que as mulheres maiores de 40 estão mais susceptíveis a desenvolver câncer de mama e estão também associadas a uma maior taxa de mortalidade por câncer de mama (BERTRAND et al., 2013; CECILIO et al., 2015; DESANTIS et al., 2016). Porém, o risco médio de uma mulher desenvolver câncer de mama foi de 1 em 173 aos 40 anos e de aproximadamente 1 em 1.500 aos 30 anos (ANDERS et al., 2009). De uma forma variada a quanto menor a idade no diagnóstico maior a probabilidade de altas de recidiva local e menor sobrevida quando as pacientes mais jovens são comparadas com mulheres mais velhas (ARVOLD et al., 2011).

Em relação a etnia, nosso estudo observou que a mulheres que se declararam pardas foram mais acometidas por câncer de mama, seguidas das pacientes que se declaram brancas. Estudo relatam que em mulheres com mais de 45 anos, o câncer de mama é mais comum em brancos do que negros. No entanto, mulheres negras com menos de 35 anos tem duas vezes mais chances de desenvolver câncer de mama invasivo e três vezes mais mortalidade por câncer de mama do que mulheres jovens brancas, (ANDERS et al., 2009; DESANTIS et al., 2016). Em relação ao tabagismos vários estudos relatam a relação do tabagismo com câncer de mama, esta associação é particularmente observada em mulheres que fumam por um longo período, ou que fumam por um longo período antes de sua primeira gravidez (CATSBURG; MILLER; ROHAN, 2015; REYNOLDS, 2013). Na nossa análise, a maioria das mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama pertenciam ao grupo de não-fumantes, consequentemente não podemos afirmar esta associação entre câncer de mama e mulheres não tabagista.

Dados recentes demonstram que a prevalência de obesidade é de 34,9% entre todos os adultos com 20 anos ou mais, enquanto que para o excesso de peso mais obesidade ($IMC \geq 25,0$) é de 68,5%. Ela tem sido associada ao risco de câncer de mama em estudos observacionais. A obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de novos casos de câncer de mama e também afeta a sobrevida em mulheres que já foram diagnosticadas com câncer de mama (NEUHOUSER et al., 2015; PROTANI; COORY; MARTIN, 2010).

Estudos já mostram a associação da obesidade com o câncer de mama e afirmam que as mulheres devem estar cientes de que se manter no peso adequado terá benefícios caso desenvolvam câncer de mama, confirmando que a obesidade é um fator prognóstico independente para o desenvolvimento de metástases à distância (EWERTZ et al., 2011). A obesidade também parece afetar a eficácia do tratamento, uma vez que foi observado que a terapia adjuvante pareceu ser menos eficaz para pacientes com câncer de mama e obesidade, estando associada a doença mais avançada e maior tamanho do tumor (MORRIS et al., 2011; NEUHOUSER et al., 2015). Contudo, o nosso estudo mostrou que 27 mulheres das 57 não foram enquadradas como obesas.

Um estudo utilizando dados observacionais prospectivos mostrou que o consumo de álcool foi significativamente relacionado ao risco de câncer de mama, nas pacientes analisadas e que quanto maior a dose diária de álcool maior a chance de desenvolvimento de câncer de mama (ROMIEU et al., 2015). Como a maioria das mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama pertenciam ao grupo que não eram usuárias de álcool, não podemos afirmar esta associação entre câncer de mama e mulheres etilista.

Em relação a histórico familiar alguns estudos mostraram uma associação entre as mulheres que declaram que tem histórico familiar de câncer de mama está associada com o desenvolvimento de câncer (BREWER et al., 2017; SHIYANBOLA et al., 2017), o que corrobora com o nosso estudo que mostra que as pacientes que responderam que tem histórico familiar desenvolveram câncer de mama

Em relação à expressão dos genes, já foi descrita a expressão de *SIRT1* nos subtipos luminal e HER2+, e *downregulation* no subtipo de Triplo negativo (RIFAÏ et al., 2017, 2018). Em pacientes com câncer de mama, a expressão *SIRT1* tem sido associada com recidiva metastática à distância e menor sobrevida livre de recidiva e sobrevida global por análise univariada (LEE et al., 2011; SUNG et al., 2010). O presente estudo demonstrou que a expressão de *SIRT1* é diferente entre o grupo Luminal e HER2+ ($p=0,0286$), porém levando em consideração a análise entre o grupo Triplo negativo e HER2+ observou-se que, mesmo o grupo Triplo negativo expressando *SIRT1* em apenas 29% das pacientes, o nível de expressão deste grupo é maior quando em comparação ao grupo HER2+. Este é um ponto controverso ao estudo que mostra *downregulation* nos subtipos Triplo negativo.

A expressão de $PPAR\gamma$ é significativamente maior em células de câncer de mama, quando em comparação com células normais, e parece haver um aumento progressivo da expressão durante a progressão do tumor em pacientes com câncer de mama (WANG; SOUTHARD; KILGORE, 2004; ZAYTSEVA et al., 2008). Porém existe uma controvérsia sobre a associação da expressão de *PPARG* com a progressão ou metástase do câncer de mama, por isso se faz necessário mais estudos sobre essa ligação (ZAYTSEVA et al., 2011). Observou-se no presente estudo uma alta expressão do gene *PPARG* no subtipo Luminal.

A IL-18 já foi observada em altos níveis nos tecidos de câncer de mama quando comparados aos tecidos de mama sem alterações malignas (SRABOVIĆ et al., 2011). Um estudo realizado para observar efeito da leptina na progressão do câncer de mama mostrou que a expressão aumentada da IL-18 induzida pela leptina foi regulada via sinalização NF- κ B / NF- κ B1 em macrófagos associados ao tumor, enquanto que em células de câncer de mama, pela via de sinalização PI3K-AKT / ATF-2, podendo levar a uma invasão e metástase do câncer (LI et al., 2016). Em relação ao grupo Triplo negativo observou-se altos níveis séricos da IL-18, e pacientes HER2+ tiveram uma baixa amplificação (PARK et al., 2017). O presente estudo entra em contradição com alguns dos achados da literatura, pois observamos que o grupo HER2+ foi o único em que todos os pacientes expressaram *IL18*. A maioria dos pacientes do grupo luminal também expressaram este gene. Os pacientes com o subtipo Triplo negativo apresentaram menor expressão quando comparados aos demais grupos.

O aumento da expressão de *SIRT1* já foi relacionado com a redução da expressão de *PPARG*, diminuindo assim a adipogênese (ADITYA et al., 2017). No nosso grupo de estudo, os resultados apresentam uma resposta oposta em relação à *SIRT1*, com uma leve correlação positiva entre este gene e o *PPARG*. Por outro lado, observamos uma correlação direta da expressão de *PPARG* em relação à *IL18*, o que vai de encontro aos achados em tecido cardíaco de ratos, que reportam que o aumento da expressão de *IL18* pode levar à menor expressão de *PPARG*, sugerindo uma regulação da *IL18* pelo *PPARG* (BHAT et al., 2017). Esta diferença pode estar relacionada ao tipo de tecido estudado e/ou à sua condição neoplásica.

6. CONCLUSÃO

As mulheres com mais de 40 anos e com histórico familiar foram as predominantes no grupo de estudo. A expressão de *SIRT1* é diferente entre o grupo Luminal e HER2+, estando ausente ou em baixos níveis nas pacientes do grupo Triplo Negativo. No grupo HER2+, todas as pacientes expressaram *PPARG* e *IL18*, mas este perfil não foi observado para o gene *SIRT1*. Por outro lado, as pacientes do grupo Triplo negativo apresentaram menor expressão para *IL18* quando comparados aos demais grupos.

A expressão dos genes *PPARG* e a *IL18* parecem estar correlacionadas no tecido mamário neoplásico, sugerindo uma relação entre a adipogênese e regulação da inflamação neste tecido, independente do tipo de câncer de mama. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor o papel desses genes tanto no tecido adiposo quanto no desenvolvimento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ADITYA, R. et al. A Review on SIRTuins in Diabetes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 16, p. 2299–2307, 20 jun. 2017.
- AHMAD, I. et al. Thymoquinone suppresses metastasis of melanoma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 270, n. 1, p. 70–76, jul. 2013.
- AHMAD, R. et al. Increased adipose tissue expression of IL-18R and its ligand IL-18 associates with inflammation and insulin resistance in obesity. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 5, n. 3, p. 318–335, set. 2017.
- ANDERS, C. K. et al. Breast Cancer Before Age 40 Years. **Seminars in Oncology**, v. 36, n. 3, p. 237–249, 27 jun. 2009.
- ARVOLD, N. D. et al. Age, Breast Cancer Subtype Approximation, and Local Recurrence After Breast-Conserving Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 29, p. 3885–3891, 10 out. 2011.
- AYALA, M. A. M. et al. **Expert Opinion on Biological Therapy IMMUNOTHERAPY FOR THE TREATMENT OF BREAST CANCER**. [s.l.] Taylor & Francis, 2017. v. 0
- BERSE, B.; LYNCH, J. A. Molecular Diagnostic Testing in Breast Cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 31, n. 2, p. 108–121, maio 2015.
- BERTRAND, K. A. et al. Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics. 2013.
- BHAT, O. M. et al. Interleukin-18-induced cell adhesion molecule expression is associated with feedback regulation by PPAR- γ and NF- κ B in Apo E $^{-/-}$ mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 428, n. 1–2, p. 119–128, 7 abr. 2017.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 12 nov. 2018.
- BREWER, H. R. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n. 1, p. 193–200, 3 ago. 2017.
- BRUUN, J. M. et al. Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. **European Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 4, p. 465–

471, out. 2007.

BUI, M. et al. Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? **Journal of Pathology Informatics**, v. 1, n. 1, p. 29, 2010.

CARBONE, A. et al. IL-18 Paradox in Pancreatic Carcinoma: Elevated Serum Levels of Free IL-18 are Correlated With Poor Survival. **Journal of Immunotherapy**, v. 32, n. 9, p. 920–931, nov. 2009.

CATSBURG, C.; MILLER, A. B.; ROHAN, T. E. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. v. 2209, p. 2204–2209, 2015.

CECILIO, A. P. et al. Breast cancer in Brazil : epidemiology and treatment challenges. p. 43–49, 2015.

CHEN, W.; YUAN, H.; SU, L. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. **OncoTargets and Therapy**, p. 1399, out. 2013.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 10, p. 2929–43, 2015.

DESANTIS, C. E. et al. Breast Cancer Statistics , 2015 : Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women. v. 66, n. 1, p. 31–42, 2016.

EWERTZ, M. et al. Effect of Obesity on Prognosis After Early-Stage Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 25–31, jan. 2011.

FANALE, D.; AMODEO, V.; CARUSO, S. The Interplay between Metabolism, PPAR Signaling Pathway, and Cancer. **PPAR research**, v. 2017, p. 1830626, 2017.

FANG, Y.; NICHOLL, M. B. Sirtuin 1 in malignant transformation: Friend or foe? **Cancer Letters**, v. 306, n. 1, p. 10–14, jul. 2011.

GODONE, R. L. N. et al. Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, n. January, p. 14–34, out. 2018.

HUI, X. et al. Adipocyte SIRT1 controls systemic insulin sensitivity by modulating macrophages in adipose tissue. **EMBO reports**, v. 18, n. 4, p. 645–657, abr. 2017.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação.** [s.l: s.n.].

IYENGAR, N. M. et al. Systemic Correlates of White Adipose Tissue Inflammation in Early-Stage Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 9, p. 2283–2289, 1 maio

2016.

JIANG, X.; SHAPIRO, D. J. The immune system and inflammation in breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 673–682, jan. 2014.

KALAGER, M. et al. Effect of Screening Mammography on Breast-Cancer Mortality in Norway. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 13, p. 1203–1210, 23 set. 2010.

KAWASAKI, N. et al. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. **Scientific Reports**, v. 2, n. 1, p. 799, 12 dez. 2012.

KOPP, T. I. et al. Polymorphisms in genes related to inflammation, NSAID use, and the risk of prostate cancer among Danish men. **Cancer Genetics**, v. 206, n. 7–8, p. 266–278, jul. 2013.

LEE, H. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. **Human Pathology**, v. 42, n. 2, p. 204–213, fev. 2011.

LI, K. et al. Leptin promotes breast cancer cell migration and invasion via IL-18 expression and secretion. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 6, p. 2479–2487, jun. 2016.

LU, Y. et al. Oridonin exerts anticancer effect on osteosarcoma by activating PPAR- γ and inhibiting Nrf2 pathway. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 1, p. 15, 11 jan. 2018.

M. CANDEIAS, S.; S. GAUPL, U. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 101–107, 2 nov. 2015.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, v. 8, n. 1, p. CPath.S31563, 21 jan. 2015.

MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. **ISRN Inflammation**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

MAYORAL, R. et al. Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPAR γ activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. **Molecular Metabolism**, v. 4, n. 5, p. 378–391, maio 2015.

MEDIGET TESHOME, M.D. AND KELLY K. HUNT, M. D. NIH Public Access. **Surg Oncol Clin N Am.**, v. 23, n. 3, p. 505–523, 2015.

MOOSSAVI, M. et al. Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 158, 17 dez. 2018.

- MORRIS, P. G. et al. Inflammation and Increased Aromatase Expression Occur in the Breast Tissue of Obese Women with Breast Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 4, n. 7, p. 1021–1029, jul. 2011.
- MUENST, S. et al. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 279, n. 6, p. 541–562, jun. 2016.
- NAZÁRIO, A. C. P.; FACINA, G.; FILASSI, J. R. Breast cancer: news in diagnosis and treatment. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 61, n. 6, p. 543–552, dez. 2015.
- NEUHOUSER, M. L. et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 5, p. 611, 1 ago. 2015.
- NIEMAN, K. M. et al. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 10, p. 1533–1541, 2013.
- OSBORN, O. et al. Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in obesity and insulin resistance. **Swiss medical weekly**, v. 138, n. 45–46, p. 665–73, 15 nov. 2008.
- OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 21 fev. 2011.
- PALMA, G. et al. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1836, n. 2, p. 296–303, dez. 2013.
- PARK, H. et al. Enhanced IL-18 expression in common skin tumors. **Immunology letters**, v. 79, n. 3, p. 215–9, 3 dez. 2001.
- PARK, H. K. et al. Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma in Prostatic Adenocarcinoma. **Journal of Korean Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 533, 2015.
- PARK, I. H. et al. Tumor-derived IL-18 induces PD-1 expression on immunosuppressive NK cells in triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 32722–32730, 16 maio 2017.
- PICARD, F. et al. Erratum: Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . **Nature**, v. 429, n. 6993, p. 771–776, 2 jun. 2004.
- POLVANI, S. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 8, p. 2441, 28 fev. 2016.

- PROTANI, M.; COORY, M.; MARTIN, J. H. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 3, p. 627–635, 23 out. 2010.
- REYNOLDS, P. Smoking and Breast Cancer. n. September 2012, p. 15–23, 2013.
- RIFAĬ, K. et al. Dual SIRT1 expression patterns strongly suggests its bivalent role in human breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 67, p. 110922–110930, 19 dez. 2017.
- RIFAĬ, K. et al. SIRT1-dependent epigenetic regulation of H3 and H4 histone acetylation in human breast cancer. **Oncotarget**, v. 9, n. 55, p. 30661–30678, 17 jul. 2018.
- RIVENBARK, A. G.; CONNOR, S. M. O.; COLEMAN, W. B. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer Challenges for Personalized Medicine. **The American Journal of Pathology**, v. 183, n. 4, p. 1113–1124, 2013.
- ROMAN, J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Lung Cancer Biology. **Journal of Investigative Medicine**, v. 56, n. 2, p. 528–533, 1 fev. 2008.
- ROMIEU, I. et al. Alcohol intake and breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 8, p. 1921–1930, 15 out. 2015.
- SHIYANBOLA, O. O. et al. Emerging Trends in Family History of Breast Cancer and Associated Risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 12, p. 1753–1760, dez. 2017.
- SRABOVIĆ, N. et al. Interleukin 18 expression in the primary breast cancer tumour tissue. **Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina**, v. 8, n. 1, p. 109–15, fev. 2011.
- SUNG, J. et al. Balance between SIRT1 and DBC1 expression is lost in breast cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 7, p. 1738–1744, 24 mar. 2010.
- TANG, W. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 8, p. 12226–38, 2015.
- VITALE, S. G. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulation during Metabolic Diseases and Cancers: Master and Minions. **PPAR Research**, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- WANG, X.; SOUTHARD, R. C.; KILGORE, M. W. The Increased Expression of

- Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ 1 in Human Breast Cancer Is Mediated by Selective Promoter Usage. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p. 5592–5596, 15 ago. 2004.
- WAWROCKI, S. et al. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 1, p. 59–63, 17 fev. 2016.
- WOOD, I. S. et al. The pro-inflammatory cytokine IL-18 is expressed in human adipose tissue and strongly upregulated by TNF α in human adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 422–429, nov. 2005.
- YAMANISHI, K. et al. Deficiency in interleukin-18 promotes differentiation of brown adipose tissue resulting in fat accumulation despite dyslipidemia. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 314, 19 dez. 2018.
- YANG, T. et al. SIRT1 and endocrine signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 5, p. 186–191, jul. 2006.
- YANG, Y. et al. Interleukin-18 enhances breast cancer cell migration via down-regulation of claudin-12 and induction of the p38 MAPK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 3, p. 379–386, abr. 2015.
- ZAYTSEVA, Y. Y. et al. Down-regulation of PPAR γ 1 suppresses cell growth and induces apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 7, n. 1, p. 90, 2008.
- ZAYTSEVA, Y. Y. et al. The PPAR γ Antagonist T0070907 Suppresses Breast Cancer Cell Proliferation and Motility via Both PPAR γ -dependent and -independent Mechanisms. In: INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (Ed.). . **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. v. 31p. 1–30.
- ZHU, W.; NELSON, C. M. Adipose and mammary epithelial tissue engineering. **Biomatter**, v. 3, n. 3, p. e24630, 19 jul. 2013.
- ZOON, C. K. et al. Current molecular diagnostics of breast cancer and the potential incorporation of microRNA. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 9, n. 5, p. 455–466, 9 jul. 2009.
- ZSCHOERNIG, B.; MAHLKNECHT, U. SIRTUIN 1: Regulating the regulator. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 2, p. 251–255, nov. 2008.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP I

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SAÚDE DA MULHER: MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DE MAMA E CERVICAL

Pesquisador: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35626514.5.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 852.334

Data da Relatoria: 30/10/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria Inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria Inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria Inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria Inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria Inicial.

Recomendações:

Recomendação:

No orçamento, o equipamento pertence ao LIKA/UFPE, portanto não seria necessário incluir no orçamento, mas informar que o Laboratório permitirá o uso do mesmo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado com recomendação.

Endereço: Av. da Engenharia s/n° - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS			
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600		
UF: PE	Município: RECIFE		
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br		

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP II

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	Plataforma Brasil
---	--	-------------------------------------

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA
CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: GLAUBER MOREIRA LEITAO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47869315.0.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.514.112

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para inclusão do Hospital Barão de Lucena como co-participante no projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificação de marcadores moleculares de importância clínica no diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores de mama, incluindo análises farmacogenéticas.

Objetivo Secundário:

•Avaliar a integridade gênica de alvos de interesse clínico no diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer de mama em amostras biológicas; •Observar a expressão de mRNA e proteínas em espécimes tumorais e sangue periférico; •

Identificar o perfil proteômico diferencial em amostras biológicas de pacientes com diferentes características clínicas e patológicas; •Identificar marcadores moleculares associados aos subtipos

de câncer de mama em amostras teciduais e sangue periférico; •Avaliar o perfil farmacogenético associado à conduta terapêutica utilizada para a paciente; •Acompanhar os desfechos clínicos (sobrevida global,

sobrevida livre de recidiva da doença, resposta terapêutica, etc.) e associar aos resultados de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO C – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO I

SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA

Questionário Epidemiológico 1 (Dados a serem coletados com o paciente)

(dado inexistente = 99)

I. Dados do Paciente:

A. Contato do Paciente:

- 1.** Iniciais: |__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|
- 2.** Número do Prontuário: |__|__|__|__|__|__|__|__|__|__|
- 3.** Endereço: _____
 Bairro: _____ CEP: |__|__|__|__|__|__| -
 |__|__|__|
- 4.** Cidade: _____
- 5.** Estado: |__|__|
- 6.** Tel. residencial: |__|__|__|__|__|__|__|__| - |__|__|__|__|
- 7.** Tel. celular: |__|__|__|__|__|__|__|__| - |__|__|__|__|
- 8.** Outro telefone: |__|__|__|__|__|__|__|__| - |__|__|__|__|
- 9.** Nome do
 contato: _____

B. Dados Pessoais do Paciente:

- 1.** Data de nascimento (dd/mm/aaaa): |__|__| / |__|__| / |__|__|__|__|
- 2.** Idade atual: |__|__|__| anos
- 3.** Sexo:
 - a)** |__| Masculino
 - b)** |__| Feminino
- 4.** Índice de Massa Corpórea [peso/(altura²)]: _____

ANEXO D – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO II

SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA

Questionário Epidemiológico 2
(Dados a serem coletados com o paciente)

(99 = dado inexistente)

I. Dados do Paciente:

A. Etnia:

1. ☐ Branco 2. ☐ Preto
3. ☐ Amarelo 4. ☐ Pardo
5. ☐ Indígena

B. Escolaridade:

1. ☐ Sem instrução e curso fundamental incompleto
2. ☐ Ensino Fundamental completo e médio incompleto
3. ☐ Ensino Médio completo e superior incompleto
4. ☐ Ensino Superior completo

II. História Pessoal do Paciente:

A. Com quantos anos ocorreu a primeira menstruação?

1. anos 2. (não sabe = 99)

B. Já cessou a menstruação (menopausa)?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

C. Se sim, com quantos anos cessou a menstruação (menopausa)?

1. anos
2. (não sabe = 99)

D. Já realizou Ooforectomia?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

E. Se realizou ooforectomia, foi realizada unilateral ou bilateral?

1. ☐ Unilateral 2. ☐ Bilateral

F. Se realizou ooforectomia, descreva o motivo da realização da mesma:

G. Já realizou Mastectomia profilática? (Para prevenção de câncer de mama)

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

H. Já realizou ligadura tubária?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

I. Já realizou Radioterapia em tórax?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

J. Se já realizou radioterapia em tórax, com quantos anos realizou?

1. anos

III. História Patológica Progressiva:

A. O(a) Sr.(a) já teve câncer (ou tumor maligno)? (Não considerar o atual de mama)

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

B. Se sim, descreva abaixo sobre o câncer que já teve: (Se houver mais de um primário, descreva cada um em cada linha)

	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Câncer 1		
Câncer 2		

IV. História Familiar

- Sobre seus filhos(as):

A. Tem filhos?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

B. Quantos filhos?

1. filhos

C. Com quantos anos teve o primeiro filho?

1. anos

D. Já amamentou?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

E. Se sim, qual o tempo total de amamentação?
(somado todas as amamentações)

1. | | | meses

F. Algum filho tem ou teve câncer?

1. | | Sim 2. | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

G. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. | | |

H. Sobre o(s) filho(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Filho 1			
Filho 2			

- Sobre seus pais:

I. Seus pais tiveram ou têm câncer?

1. | | Sim 2. | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

J. Sobre o(s) pais(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Pai		
Mãe		

- Sobre seus avós paternos:

K. Eles tiveram ou têm câncer?

1. | | Sim 2. | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

L. Sobre o(s) avó(s) paternos com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Avó paterna		
Avô paterno		

M. Qual a origem dos avós paternos?

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. Brasileiro | 7. Português |
| 2. Judeu Ashkenazi | 8. Espanhol |
| 3. Judeu Sefaradi | 9. Sírio-Libanês |
| 4. Indígena | 10. Italiano |
| 5. Negro | 11. Ucrainiano |
| 6. Alemão | 12. Polonês |
| 13. Japonês | |
| 14. Outros: _____ | |

- Sobre seus avós maternos:

N. Eles tiveram ou têm câncer?

1. | | Sim 2. | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

O. Sobre o(s) avó(s) maternos com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Avó materna		
Avô materno		

P. Qual a origem dos avós maternos?

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. Brasileiro | 7. Português |
| 2. Judeu Ashkenazi | 8. Espanhol |
| 3. Judeu Sefaradi | 9. Sírio-Libanês |
| 4. Indígena | 10. Italiano |
| 5. Negro | 11. Ucrainiano |
| 6. Alemão | 12. Polonês |
| 13. Japonês | |
| 14. Outros: _____ | |

- Sobre seus irmãos:

Q. Quantos irmãos (irmãs) tem? (Incluindo meios-irmãos)

1. | | | irmãos 2. | | | irmãs

R. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

R. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

T. Sobre o(s) irmão(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Irmão 1			
Irmão 2			

- Sobre seus tios paternos:

U. Quantos tios e tias paternos tem? (Incluindo os falecidos)

1. | | | tios 2. | | | tias

3. | | | (não sabe = 99)

V. Algum deles tiveram ou têm câncer?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

W. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. | | |

X. Sobre os(as) tios(as) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Tio (a) paterno (a) 1			
Tio (a) paterno (a) 2			

- Sobre seus tios maternos:

Y. Quantos tios e tias maternas tem? (Incluindo os falecidos)

1. | | | tios 2. | | | tias

3. | | | (não sabe = 99)

Z. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

AA. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. | | |

BB. Sobre os(as) tios(as) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Tio (a) materno (a) 1			
Tio (a) materno (a) 2			

- Sobre seus netos:

CC. Quantos netos(as) tem? (Incluindo os falecidos)

1. | | | 2. | | | (não sabe = 99)

DD. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

EE. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. | | |

FF. Sobre o(s) neto(s) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Neto (a) 1			

Neto (a) 2			
---------------	--	--	--

- Sobre seus sobrinhos:

GG. Quantos sobrinhos(as) tem? (Incluindo os falecidos)

1. | | | 2. | | | (não sabe = 99)

HH. Algum deles tiveram ou tem câncer?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

II. Se sim, quantos tiveram câncer?

1. | | |

JJ. Sobre o(s) sobrinhos(as) com câncer, preencha a tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Sobrinho (a) 1			
Sobrinho (a) 2			

KK. Alguém mais na família teve câncer? (Primos, tio-avô...) Se sim, preencha na tabela abaixo:

	Gênero (F/M)	Idade ao diagnóstico	Que tipo? (Onde começou)
Sobrinho (a) 1			
Sobrinho (a) 2			

V. Comorbidades:

A. Tem diagnóstico de Hipertensão arterial?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

B. Tem diagnóstico de Diabetes?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

C. Tem diagnóstico de Insuficiência cardíaca?

1. | | | Sim 2. | | | Não

3. | | | (não sabe = 99)

D. Se tiver diagnóstico de algum outro problema de saúde, descreva qual:

E. É fumante ou é ex-fumante?

1. | | | Sim 2. | | | Não

F. Se sim, com quantos anos iniciou?

1. | | | anos

G. Se sim, que tipo de fumo? (palha, cachimbo, cigarro comum...)

H. Se sim, quantos cigarros por dia?

1. | | | cigarros

I. Se parou de fumar, com quantos anos parou?

1. | | | anos

J. Faz uso de bebida alcoólica?

1. | | | Sim 2. | | | Não

K. Se sim, quantos drinks por semana? (Colocar a soma do número de copos de cerveja + taças de vinho + doses de destilado tomados na semana)

1. | | | drinks

VI. Medicções:

A. Já fez uso (ou está em uso) de pílula anticoncepcional?

1. | | | Sim 2. | | | Não

B. Se já fez uso de pílula anticoncepcional, com quantos anos iniciou?

1. | | | anos

C. Se parou o uso de pílula anticoncepcional, com quantos anos parou? (Se está em uso, favor comunicar a equipe médica)

1. | | | anos

D. Já fez uso (ou está em uso) de Terapia de Reposição Hormonal oral (TRH)? (Se está em uso, favor comunicar a equipe médica)

1. | | | Sim 2. | | | Não

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA

Você está sendo convidada a participar desta pesquisa porque você recebeu o diagnóstico de câncer de mama. Para que você possa decidir se quer participar deste estudo, a seguir serão esclarecidos os objetivos da pesquisa que será feita no seu material genético, a fim de que todas as informações importantes sejam explicadas. Assim, você poderá tomar sua decisão conhecendo todos os benefícios, riscos e implicações que possam ocorrer devido à pesquisa. Caso tenha alguma dúvida ou não tenha entendido algo, por favor, pergunte novamente até que tenha compreendido tudo. Esclarecemos ainda que você é livre em decidir se gostaria de participar deste estudo e que isso não influenciará seu tratamento ou seu atendimento neste hospital. Dessa forma, este estudo não implicará em nenhuma mudança no tratamento que seu médico prescrever.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é identificar alterações genéticas que ocorrem em mulheres da nossa região que apresentam câncer de mama através de uma análise do sangue e do tecido do tumor da mama. Através da análise deste material tentaremos descobrir alterações genéticas que possam estar associadas a uma resposta adequada ou não frente aos tratamentos, possibilidade de descoberta de novos métodos diagnósticos, bem como identificar possíveis biomarcadores relacionados ao sucesso terapêutico.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Para participar do estudo você deverá fornecer amostras de sangue e do tecido tumoral de mama para a realização dos testes genéticos. O material genético será extraído do tecido do tumor da mama e do sangue e, através de técnicas de laboratório, será feito a pesquisa de alterações genéticas. **Importante:** O material tumoral da mama será obtido durante procedimentos para diagnóstico ou tratamento nesta instituição.

Caso receba a indicação médica de tratamento com algum medicamento oncológico de uso prolongado (para uso previsto em tempo maior que um mês) poderá ser solicitado que você participe de uma nova coleta de sangue. Coletaremos amostras de sangue durante o primeiro ano deste tratamento (antes do uso, 3 meses, 6 meses e 12 meses após início do uso da medicação), para sabermos quanto dele foi metabolizado e excretado desta medicação, bem como pesquisa de possíveis proteínas associadas ao processo cancerígeno (biomarcadores). Nestes dias de coleta você deverá estar em jejum por pelo menos 4 horas e não deverá ter feito uso de qualquer bebida alcoólica. A coleta de sangue é feita na veia do braço com uma agulha, sendo retirado o equivalente a duas colheres de sopa de sangue para o teste. Os testes genéticos serão realizados no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), onde todo o material ficará armazenado.

Além dos dados citados acima, serão coletadas algumas informações sobre sua doença e sobre os medicamentos dos quais faz uso. Para tal solicitaremos que você participe de uma breve entrevista ao assinar este documento e demais informações serão coletados do seu prontuário e com seu médico. Coletaremos dados tais como idade, sexo, histórico reprodutivo, localização do tumor, tipo do tumor, e tratamentos que você já fez, além de resultados clínicos e laboratoriais pertinentes ao seu tratamento.

Se for o caso de utilizar medicação oncológica de uso prolongado, serão realizadas entrevistas durante a sua consulta com a equipe médica responsável pelo seu tratamento para determinar se você vem tomando a medicação de modo adequado ou se você tem alguma queixa relacionada ao uso da medicação. Todas informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Se você concordar em participar desse estudo, o seu médico fará uma solicitação ao laboratório de patologia dos blocos de parafina do tumor de mama para uma revisão das lâminas.

Você será acompanhada quanto ao seu tratamento pela equipe médica da instituição e continuará realizando suas consultas e exames laboratoriais conforme rotina da instituição e curso do seu tratamento.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não existem métodos alternativos a sua participação neste estudo. Caso você não queira participar, nenhuma amostra será coletada ou analisada, bastando para isso, que você não assine este Termo de Consentimento. Seu acompanhamento ou tratamento não será modificado pelo fato de você não querer participar deste estudo.

RISCOS

O seu tratamento e acompanhamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A obtenção da amostra do tecido do tumor da mama que está arquivado, não oferecerá riscos a você. Se o material do tumor for coletado durante o procedimento de diagnóstico ou tratamento cirúrgico, o procedimento não alterará a rotina estabelecida pelo seu médico na obtenção da amostra. Para a obtenção da amostra de sangue poderá haver algum desconforto no local da coleta, como dor leve ou um pequeno hematoma (mancha roxa) que devem sumir em algumas horas ou em poucos dias. Esclarecemos que caso não aceite mais participar do estudo é garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

BENEFÍCIOS

Inicialmente, a pesquisa não trará nenhum benefício para você. No entanto essa pesquisa poderá aumentar o conhecimento sobre câncer de mama em mulheres da nossa região, possibilitando melhorias no diagnóstico e tratamento no futuro.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O seu médico será informado e terá acesso a todos os resultados desta pesquisa, e poderá informá-la dos resultados caso você deseje.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

É importante que você saiba que os registros médicos e resultados desta pesquisa estarão disponíveis para serem consultados apenas pela equipe de saúde que cuidará de você, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP-CCS/UFPE), além da equipe de pesquisadores envolvidos.

Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Durante toda a condução do estudo você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

CUSTOS

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida e as amostras já coletadas serão descartadas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins, Dr. Glauber Moreira Leitão ou Dr. Darley Ferreira no telefone (81) 2126-8484 ou (81) 2126-3650. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1o Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-800, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Acredito ter sido suficientemente esclarecida a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "SAÚDE DA MULHER: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CANCER DE MAMA"

Eu discuti com a equipe do estudo sobre a minha decisão em participar nesse estudo e fica decidido por mim participar deste estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de sangue adicionais aos necessários a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

Recife/PE, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente/representante legal

Assinatura do Pesquisador Principal

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: