

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**

**Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada**

**REDUÇÃO DO EFLUXO DE COLESTEROL CELULAR MEDIADO**  
**PELA LIPOPROTEÍNA DE DENSIDADE ALTA (HDL) E ALTERAÇÃO**  
**NA COMPOSIÇÃO DESTA LIPOPROTEÍNA EM MULHERES COM**  
**CÂNCER DE MAMA**

**São Paulo, SP**  
**2021**

**MARIA ISABELA BLOISE ALVES CALDAS SAWADA**

**REDUÇÃO DO EFLUXO DE COLESTEROL MEDIADO PELA  
LIPOPROTEÍNA DE DENSIDADE ALTA (HDL) E ALTERAÇÃO NA  
COMPOSIÇÃO DESTA LIPOPROTEÍNA EM MULHERES COM  
CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina – Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

**São Paulo, SP**

**2021**

Sawada, Maria Isabela Bloise Alves Caldas.

Redução do efluxo de colesterol celular mediado pela lipoproteína de densidade alta (HDL) e alteração na composição desta lipoproteína em mulheres com câncer de mama. / Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada. 2021.

115 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Marisa Passarelli.

- Câncer de mama. 2. Óxidos de colesterol. 3. HDL. 4. Efluxo de colesterol. 5. 27-hidroxicolesterol. 6. Biomarcador.
- Passarelli, Marisa. III. Título

CDU 616



São Paulo 01 de dezembro de 2021

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluna: **MARIA ISABELA BLOISE ALVES CALDAS SAWADA**

Título da tese: **REDUÇÃO DO EFLUXO DE COLESTEROL CELULAR MEDIADO PELA LIPOPROTEÍNA DE DENSIDADE ALTA (HDL) E ALTERAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DESTA LIPOPROTEÍNA EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA.**

Presidente: **PROFA. DRA. MARISA PASSARELLI**

Membro: **PROF. DR. CLEBER PINTO CAMACHO**

Membro: **PROFA. DRA. MÁRCIA SILVA QUEIROZ**

Membro: **PROF. DR. EDER CARLOS DA ROCHA QUINTÃO**

Membro: **PROF. DR. LUIZ HENRIQUE GEBRIM**

A Deus e Meishu-Sama, pela proteção recebida.  
Aos meus pais, Elio e Mariinha (*in memorian*), que  
me ensinaram sobre disciplina e resiliência.  
Aos queridos Rui, Maria Beatriz e João Gabriel,  
pelo amor e paciência para comigo. À minha  
família, meu porto seguro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todos aqueles que colaboraram para esta tese, pois somente assim foi possível concluir esta nobre missão:

- À Prof. Dra. Marisa Passarelli, minha orientadora, cujo brilhantismo profissional e entusiasmo pela ciência são contagiantes! Indubitavelmente, uma grande pesquisadora, que me servirá de exemplo para a vida;
- Aos Cel Med Aer Sidney Dionísio Toledo e Alexandre Araújo Mello, diretores do Hospital de Força Aérea de São Paulo (HFASP), pela autorização para cursar o doutorado e pelo apoio no aprimoramento profissional;
- Ao efetivo da Divisão Médica e Divisão de Ensino e Pesquisa do HFASP, pela compreensão, apoio e estímulo;
- Aos queridos Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim, Prof. Dr. Jorge Yoshinori Shida e Prof. Dr. André Mattar, pela inspiração e valiosa parceria ao longo de 15 anos no Hospital Pérola Byington;
- À equipe de enfermagem do Hospital Pérola Byington, pela inestimável ajuda no recrutamento de voluntárias e auxílio na coleta das amostras, em especial Aline Cristina da Silva, Cleide Almeida da Silva, Marly Gonçalves de Souza, Railda Maria da Silva Santos e Simone Rebello; bem como aos médicos assistentes, residentes e funcionários que contribuíram com valiosas sugestões;
- À equipe do Laboratório de Lípidos (LIM10) da Faculdade de Medicina da USP, pelo acolhimento, aprendizado e camaradagem durante esse período. Minha gratidão especial às queridas Monique Mello, Valeria Nunes, Kelly Gomes e Sayonara Assis, pela preciosa ajuda com os experimentos, e à Claudia Souza, pelo apoio administrativo;
- Aos colegas de pós-graduação Lucas Alves e Amarilis Campos (UNINOVE), pela parceria e cooperação no laboratório;
- À Dra. Mozânia Reis (UNINOVE e UBS Dra. Ilza W. Hutzler), cujo auxílio no recrutamento das voluntárias saudáveis foi de inestimável valor;

- Aos ministros Douglas Yudiro Jomori e Carla Patrícia Paiva Véga (Johrei Center Brás Leme), pela colaboração no recrutamento de voluntárias saudáveis;
- Aos sempre pró-ativos secretários, hábeis em resolver problemas administrativos e logísticos de toda ordem: 2S SAD Diogo Gonçalves Bertholino, 2S SRD Danilo Augusto da Costa Cipriano e 2S SGS Douglas Alessandro Silva de Souza (HFASP), Ana Cláudia Constantino Marques e Marília Augusta Mendonça (Hospital Pérola Byington) e Daniela Nunes de Medeiro (UNINOVE);
- Às alunas de Iniciação Científica da UNINOVE Rafaela Viel, Karina Codina López Barbosa Lima, Jessica Valverde e Julia Helena Chiarinotti Dezotti, pela disponibilidade em ajudar com a revisão dos prontuários e pelo entusiasmo com a Medicina;
- Aos professores e funcionários da UNINOVE, pelo suporte ao longo desta caminhada;
- Aos discentes do PPG da UNINOVE, pela companhia e aprendizado mútuos, em especial Allan Hatum, Carolina Costa Santos, Fernando da Silva Sant'anna, Jorge Alexandre Peres, Maria Beatriz Cordeiro de Noronha Pessoa e Robson Luiz Bandoni;
- Aos queridos Dr. Alexandre Santos Mellito, Dra. Marina Diógenes Teixeira e Dra. Aline Bortolloto di Pace, pelo estímulo e paciência;
- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa;

Finalmente, mas de suma importância, agradeço às voluntárias que participaram do estudo e assim contribuíram para novas perspectivas sobre o câncer de mama: minha sincera admiração !

"Toda a felicidade ao longo da vida, pode-se dizer,  
resume-se na palavra saúde." Mokiti Okada

**RESUMO. Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada. Redução do efluxo de colesterol mediado pela lipoproteína de densidade alta (HDL) e alteração na composição desta lipoproteína em mulheres com câncer de mama.** A etiopatogenia do câncer de mama é diversa e a classificação molecular dos tumores e o estadiamento clínico são ferramentas prognósticas e preditivas. A elevação plasmática do colesterol total (CT) e a redução do colesterol na lipoproteína de densidade alta (HDLc) são apontadas como possíveis contribuintes para o desenvolvimento do câncer de mama. Derivados oxigenados do colesterol - óxidos de colesterol (OC) - encontram-se aumentados na hipercolesterolemia e se associam com proliferação e metástase. Além disso, aumentam o insulto oxidativo celular e perturbam a homeostase lipídica, em parte por diminuírem o conteúdo do receptor de lipoproteínas de densidade alta (HDL), ABCA-1. Isto prejudica a remoção de colesterol pelas HDL, o que aumenta a concentração intracelular de lípidos e OC. No presente estudo avaliou-se em mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama invasivo: a) a concentração de lípidos plasmáticos; b) a composição da HDL em OC, CT, triglicérides (TG), fosfolípidos (FL) e apoA-I; c) a capacidade da HDL em remover <sup>14</sup>C-colesterol de macrófagos; e d) a associação entre as variáveis supracitadas com a classificação molecular do tumor e estágio da doença. Foram incluídas mulheres entre 18 e 80 anos de idade, com diagnóstico recente de câncer de mama, virgens de tratamento e em qualquer estágio clínico do tumor (n=186). Mulheres sem câncer de mama foram incluídas como grupo controle (n=150). A concentração plasmática de lípidos foi determinada por ensaios enzimáticos e as apolipoproteínas (apo), por imunoturbidimetria. A HDL foi isolada por ultracentrifugação do plasma em gradiente descontínuo de densidade e os OC determinados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A remoção de colesterol celular pela HDL foi determinada em macrófagos previamente sobrecarregados com colesterol e <sup>14</sup>C-colesterol. A frequência dos tipos moleculares de câncer de mama foi: luminais A e B (67,3%), HER2 (16,9%) e triplo negativo (TN; 15,8%). A concentração plasmática de CT, TG, HDLc, colesterol na lipoproteína de densidade baixa (LDLc) e muito baixa (VLDLc), CT/apoB e TG/HDLc foi semelhante entre os grupos câncer de mama e controle. Maior concentração de TG (27,5%) e de VLDLc (31,3%) foi observada no TN em comparação ao HER2. Os lípidos plasmáticos foram semelhantes entre a doença nos estágios agrupados I, II e III, IV. Menor concentração de CT (18%), FL (10%) e

27-hidroxicolesterol (38,5%) foi observada na HDL do grupo câncer de mama em comparação ao controle. No entanto, a remoção de colesterol celular foi semelhante entre as HDL de ambos os grupos. Não houve diferença na composição da HDL entre os estágios da doença, porém nos estágios III e IV o efluxo de colesterol foi 28,6% menor em comparação à doença nos estágios I e II. Os achados evidenciam que a funcionalidade da HDL, prejudicada no câncer de mama avançado, desvincula-se de alterações em sua composição e nos lípides plasmáticos.

**Palavras-chave:** câncer de mama, óxidos de colesterol, HDL, efluxo de colesterol, 27-hidroxicolesterol, biomarcador de câncer de mama.

**ABSTRACT. Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada. Reduced high-density lipoprotein (HDL)-mediated cell cholesterol efflux and alteration in the composition of this lipoprotein in women with breast cancer.** The etiopathogenesis of breast cancer is diverse and the molecular classification of tumors and clinical staging are prognostic and predictive tools. Elevated plasma total cholesterol (TC) and reduced high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) are considered as possible contributors to the development of breast cancer. Oxygenated cholesterol derivatives - oxysterols (OX) - are increased in hypercholesterolemia and are associated with proliferation and metastasis. Furthermore, they increase cellular oxidative insult and disrupt lipid homeostasis, in part by decreasing the content of the high-density lipoprotein (HDL) receptor, ABCA-1. This impairs cholesterol removal by HDL, increasing intracellular concentration of lipids and OX. In the present study, it was evaluated in newly diagnosed women with invasive breast cancer: a) the concentration of plasma lipids; b) HDL composition in OX, TC, triglycerides (TG), phospholipids (PL), and apoA-I; c) the ability of HDL in removing <sup>14</sup>C-cholesterol from macrophages; and d) the association between the aforementioned variables with the molecular classification of the tumor and stage of the disease. Women between 18 and 80 years of age, with a recent diagnosis of breast cancer, treatment-naïve, and in any clinical stage of the tumor were included (n=186). Women without breast cancer were included as a control group (n=150). Plasma lipids were determined by enzymatic assays and apolipoproteins (apo) by immunoturbidimetry. HDL was isolated by plasma discontinuous density gradient ultracentrifugation, and OX determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry. HDL-mediated cell cholesterol removal was determined in macrophages previously overloaded with cholesterol and <sup>14</sup>C-cholesterol. The frequency of molecular types of breast cancer was: luminal A and B (67.3%), HER2 (16.9%), and triple-negative (TN; 15.8%). Plasma TC, TG, HDLc, cholesterol in low-density lipoprotein (LDLc) and very low-density (VLDLc), CT/apoB, and TG/HDLc were similar between breast cancer and control groups. A higher concentration of TG (27.5%) and VLDLc (31.3%) was observed in TN compared to HER2. Plasma lipids were similar between localized and advanced diseases. A lower concentration of TC (18%), PL (10%), and 27-hydroxicholesterol (38.5%) was observed in the HDL of the breast cancer as compared to the control group. However, cellular cholesterol removal was similar between HDL from both

groups. There was no difference in the composition of HDL between the stages of the disease, however, in III and IV stages of disease, cholesterol efflux was 28.6% lower compared to I and II stages. The findings show that the functionality of HDL, impaired in advanced breast cancer, is independent of changes in its composition and plasma lipids.

**Keywords: breast cancer, oxysterols, HDL, cholesterol efflux, 27-hydroxycholesterol, breast cancer biomarker.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 – Classificação molecular do câncer de mama.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 2 – Características clínicas dos tipos moleculares de câncer de mama.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3 – Formação dos óxidos de colesterol por meio de vias enzimáticas e não enzimáticas.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4 – Perfil de lípides plasmáticos nos tipos moleculares de câncer de mama.</b>	<b>49</b>
<b>Figura 51 – Composição da HDL em lípides e apo A-I nos grupos câncer de mama e controle.</b>	<b>55</b>
<b>Figura 61 – Composição da HDL em 27HC nos grupos câncer de mama e controle.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 7 – Curva ROC do 27HC nos grupos controle <i>versus</i> câncer de mama.</b>	<b>58</b>
<b>Figura 82 – Composição da HDL em lípides e apoA-I, de acordo com o tipo molecular de câncer de mama.</b>	<b>59</b>
<b>Figura 92 – Composição da HDL em lípides e apo A-I de acordo com os estágios da doença.</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Idade, dados antropométricos e clínicos</b>	<b>45</b>
<b>Tabela 2 – Características do grupo câncer de mama</b>	<b>46</b>
<b>Tabela 3 – Tipos moleculares de câncer de mama por estado menopáusicos</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 4 – Perfil de lípidos plasmáticos em mulheres controles e com câncer de mama</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 5 – Perfil de lípidos plasmáticos nos tipos moleculares agrupados de câncer de mama</b>	<b>51</b>
<b>Tabela 6 – Perfil de lípidos plasmáticos no TN em comparação aos demais tipos moleculares de câncer de mama</b>	<b>52</b>
<b>Tabela 7 – Perfil de lípidos plasmáticos de acordo com os estágios do câncer de mama</b>	<b>53</b>
<b>Tabela 8 – Perfil de lípidos plasmáticos de acordo com o estágio agrupado da doença</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 9 – Concentração de OC na HDL nos grupos controle e câncer de mama</b>	<b>56</b>
<b>Tabela 10 – Efluxo de <sup>14</sup>C-colesterol mediado pela HDL, perfil lipídico e composição da HDL em mulheres com câncer de mama e controles</b>	<b>61</b>
<b>Tabela 11 – Efluxo de <sup>14</sup>C-colesterol e variáveis clínicas e lipídicas de acordo com os estágios agrupados</b>	<b>63</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABCA-1</b>	<b>Transportador cassete de ligação ao trifosfato de adenosina, subfamília ABCA, membro 1</b>
<b>ABCG-1</b>	<b>Transportador cassete de ligação ao trifosfato de adenosina, subfamília ABCG, membro 1</b>
<b>ACAT</b>	<b>Acilcolesterol aciltransferase (esterol O aciltransferase) AGE</b>
	<b>Produtos da glicação avançada apoA-I      Apolipoproteína A-I</b>
<b>apoB</b>	<b>Apolipoproteína B</b>
<b>apoE</b>	<b>Apolipoproteína E</b>
<b>ATM</b>	<b>Gene da ataxia-telangiectasia mutado</b>
<b>AUC</b>	<b>Área embaixo da curva</b>
<b>BRCA1</b>	<b>Gene 1 do câncer de mama</b>
<b>BRCA2</b>	<b>Gene 2 do câncer de mama</b>
<b>CT</b>	<b>Colesterol total</b>
<b>BHT</b>	<b>Hidroxitolueno butilado</b>
<b>CYP7B1</b>	<b>Citocromo P450, família 7, subfamília B, membro 1, 25-hidroxicolesterol 7-alfa-hidroxilase</b>
<b>CYP27A1</b>	<b>Citocromo P450, família 27, subfamília A, membro 1, esterol 27-hidroxilase</b>
<b>FL</b>	<b>Fosfolípides</b>
<b>FAFA</b>	<b>Albumina isenta em ácidos graxos</b>
<b>HDL</b>	<b>Lipoproteína de densidade alta</b>
<b>HDLc</b>	<b>Colesterol na lipoproteína de densidade alta</b>
<b>HER2</b>	<b>Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano</b>
<b>HMGCoAr</b>	<b>Hidroximetilglutaril coenzima A redutase</b>
<b>IC</b>	<b>Intervalo de confiança</b>
<b>IMC</b>	<b>Índice de massa corporal</b>
<b>INSIG</b>	<b>Proteína gene 1 induzido por insulina</b>
<b>Ki67</b>	<b>Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki67</b>
<b>LA</b>	<b>Luminal A</b>

<b>LB</b>	<b>Luminal B</b>
<b>LDL</b>	<b>Lipoproteína de densidade baixa</b>
<b>LDLc</b>	<b>Colesterol na lipoproteína de densidade baixa</b>
<b>LDLr</b>	<b>Receptor de LDL</b>
<b>LXR</b>	<b>Receptor X hepático</b>
<b>OC</b>	<b>Óxidos de colesterol</b>
<b>OR</b>	<b>Razão de chance</b>
<b>RAGE</b>	<b>Receptor de produto de glicação avançada</b>
<b>RE</b>	<b>Receptor de estrogênio</b>
<b>ROC</b>	<b>Característica de operação do receptor</b>
<b>ROS</b>	<b>Espécies reativas de oxigênio</b>
<b>RP</b>	<b>Receptor de progesterona</b>
<b>RR</b>	<b>Risco relativo</b>
<b>RXR</b>	<b>Receptor X de ácido retinoico</b>
<b>SERM</b>	<b>Modulador seletivo do receptor de estrogênio</b>
<b>SREBP</b>	<b>Proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol</b>
<b>TG</b>	<b>Triglicérides</b>
<b>TN</b>	<b>Triplo negativo</b>
<b>TP53</b>	<b>Gene supressor de tumor</b>
<b>VEGF</b>	<b>Fator de crescimento endotelial vascular</b>
<b>VLDL</b>	<b>Lipoproteína de densidade muito baixa</b>
<b>VLDLc</b>	<b>Colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa</b>
<b>24HC</b>	<b>24-hidroxicolesterol</b>
<b>25HC</b>	<b>25-hidroxicolesterol</b>
<b>27HC</b>	<b>27-hidroxicolesterol</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1. Câncer de mama: epidemiologia e fatores de risco	17
1.2. Classificação histológica do câncer de mama	19
1.3. Classificação molecular do câncer de mama	20
1.4. Estadiamento do câncer de mama	24
1.5. Colesterol e câncer de mama	25
1.5.1. Óxidos de colesterol, HDL e câncer de mama	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>36</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
4.1. Casuística	38
4.2. Classificação molecular do câncer de mama	38
4.3. Obtenção de amostras de plasma.....	39
4.4. Isolamento da HDL	39
4.5. Quantificação de óxidos de colesterol na HDL	40
4.6. Acetilação de LDL	41
4.7. Remoção de <sup>14</sup> C-colesterol de macrófagos mediada pela HDL	41
4.8. Análise estatística	42
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1. Características dos grupos	44
5.2. Perfil lipídico	47
5.3. Composição da HDL	54
5.4. Funcionalidade da HDL	60
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>64</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>

<b>APÊNDICE A – Frequência dos tipos moleculares de câncer de mama segundo o estadiamento clínico e o estado menopáusico</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE B –Frequência do câncer de mama segundo estágios agrupados e estado menopáusico</b>	<b>86</b>

<b>APÊNDICE C – Perfil de lípides plasmáticos por tipos moleculares de câncer de mama</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE D – Perfil de lípides plasmáticos por estágio da doença</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE E – Composição da HDL em mulheres com câncer de mama e em controles</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE F – Perfil lipídico em subgrupo de mulheres com quantificação de OC na HDL</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE G – Composição da HDL por tipos moleculares</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE H – Composição da HDL por estágios da doença</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE I – Efluxo de <sup>14</sup>C-colesterol segundo tipo molecular e estágio da doença</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO A – Aprovações dos Comitês de Ética</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO B – Termos de consentimento livre e esclarecido</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO C – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais</b>	<b>115</b>

## 1.

### 1.1. CÂNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

O câncer de mama constitui-se em doença altamente prevalente na população mundial. Nos Estados Unidos são esperados 281.550 novos casos para 2021, o que corresponde a 14,8% de todos as neoplasias naquele país <sup>1</sup>. Para o Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam 66.280 novos casos de câncer de mama para no mesmo período, com um risco estimado de 43,74 casos a cada 100 mil mulheres. O impacto do câncer de mama na população feminina brasileira ensejou a criação de estratégias governamentais para o enfrentamento da doença, colocando o câncer de mama como uma prioridade na agenda de saúde do país <sup>2</sup>.

O aumento de idade e o sexo feminino são fatores de risco estabelecidos para o câncer de mama. Sua manifestação é pouco comum em mulheres abaixo dos 40 anos, mas aumenta significativamente com a idade. A incidência de câncer de mama invasivo, em mulheres abaixo de 50 anos é de 44 casos a cada 100.000 mulheres, aumentando para 345 casos a cada 100.000 mulheres acima de 50 anos de idade, conforme dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results* <sup>1</sup>.

Os fatores de risco reprodutivos, tais como menarca precoce (<12 anos), idade na primeira gestação (>30anos) e menopausa tardia (>55 anos), também costumam ser associados ao câncer de mama, especialmente aqueles que expressam receptores para estrogênio, possivelmente devido à exposição prolongada aos hormônios sexuais durante a menacme <sup>2,3,4,5</sup>. Mulheres nuligestas ou com baixa paridade, ou ainda, as que não amamentaram ou o fizeram por curto período também são consideradas como sendo de maior risco para o câncer de mama <sup>3</sup>. As associações entre o câncer de mama e a idade da menarca, assim como a idade do primeiro parto, foram maiores para o tipo lobular quando comparado ao tipo ductal, possivelmente porque os tumores lobulares expressam, com maior frequência, receptores hormonais <sup>6</sup>. Embora o uso de terapia hormonal sistêmica para alívio dos sintomas do climatério pareça ser associado ao maior risco de câncer de mama, existem diferenças nos riscos de incidência e de mortalidade pela doença em relação aos esquemas terapêuticos utilizados e à duração do tratamento <sup>7,8,9</sup>, permanecendo um tema controverso na prática clínica <sup>10</sup>.

O antecedente pessoal de certas patologias mamárias também se correlaciona com o maior risco de desenvolver câncer de mama. Em um estudo com 674 espécies de biópsias benignas, provenientes de 120 casos que desenvolveram câncer de mama subsequentemente e 382 controles, em um período de até 20 anos de seguimento, houve confirmação de risco associado a certos tipos de lesões mamárias benignas. Hiperplasia lobular atípica foi o fator de risco mais significativo para o câncer de mama, tendo apresentado risco relativo (RR) de 4,55 (intervalo de confiança [IC 95%] 1,77-11,69). Para a hiperplasia ductal atípica, o RR foi 2,03 (IC 95% 0,80-1,39) <sup>11</sup>.

O histórico prévio de câncer de mama em familiares pode aumentar o risco em até 5 vezes nas mulheres que têm dois ou mais parentes de primeiro grau afetados. A presença de familiar de primeiro grau portador de câncer de ovário, especialmente se antes dos 50 anos de idade, associa-se com aumento do risco de câncer de mama, podendo refletir variantes alélicas patogênicas dos genes *BRCA1* ou *BRCA2* <sup>12</sup>. Anormalidades genéticas são observadas em 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama ou ovário e outros genes de suscetibilidade ao câncer não *BRCA* também foram identificados, após sequenciamento em larga escala (*ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN* e *TP53*, entre outros) <sup>13</sup>.

Associações entre risco de desenvolver câncer de mama e tabagismo são controversas, aparentando haver maior risco em caso de exposição. Um estudo acompanhou mais de 50.000 mulheres com idades de 35 a 74 anos durante aproximadamente 6,4 anos, tendo verificado que o tabagismo ativo ou passivo na vida adulta não foi associado com risco de câncer de mama. No entanto, exposições passivas na infância aumentaram em até 17% o risco de câncer de mama em relação às não expostas, concluindo que pode haver uma janela de oportunidade na associação entre risco de câncer de mama e tabaco, especialmente na infância e adolescência <sup>14</sup>. De maneira semelhante, a exposição a altas doses de radiação ionizante ocorridas em idades precoces acarreta maior risco de câncer de mama, como aquelas decorridas de explosões nucleares ou tratamentos médicos direcionados ao tórax <sup>15</sup>.

Estudos epidemiológicos evidenciaram uma relação positiva entre câncer de mama após a menopausa com obesidade, sedentarismo e consumo de álcool, fatores que podem provavelmente prevenir o aparecimento da doença se modificados <sup>5</sup>. Kotsopoulos *et al* <sup>6</sup> avaliaram prospectivamente em um estudo observacional a associação entre exposições hormonais e não hormonais (estilo de vida) e o risco definido pelo tipo histológico em mais de

5.000 casos de câncer de mama na pós-menopausa do *Nurses' Health Study*. O índice de massa corporal (IMC) foi positivamente associado com carcinomas ductal e lobular da mama, sendo que as mulheres com  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$  apresentaram RR de 1,60 (IC 95%, 1,42-1,80) e 1,47 (IC 95%, 1,08-2,00) para os tipos ductal e lobular, respectivamente.

Alterações no metabolismo lipídico emergiram mais recentemente como possíveis fatores de risco independentes para o câncer de mama, em mulheres na pré e pós-menopausa

16,17 18

, bem como para a recorrência da doença. O uso de estatinas, medicação frequentemente usada para o tratamento da hipercolesterolemia, reduziu o risco de recorrência em alguns tipos de cânceres de mama, como demonstrado por Kwan *et al*<sup>19</sup>. Porém, o papel das estatinas na prevenção do câncer de mama permanece controverso e pode ser atribuído aos efeitos pleiotrópicos destes medicamentos, independentemente da redução de colesterol plasmático e colesterol na lipoproteína de densidade baixa (LDLc)<sup>20</sup>.

## 2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA

A neoplasia mamária mais frequente é do tipo carcinoma, havendo descrição de mais de 20 tipos histológicos, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Tal classificação é baseada na descrição microscópica do padrão arquitetural do crescimento e dos aspectos citológicos dos tumores<sup>21</sup>.

O carcinoma ductal invasivo sem outra especificação é a neoplasia maligna mamária mais comum (aproximadamente 75% de todos os cânceres de mama) e costuma apresentar prognóstico ruim quanto à sobrevida global. O carcinoma lobular invasivo corresponde a cerca de 15% de todos os cânceres de mama e possui maior chance de bilateralidade quando comparado aos outros tipos, além de melhor prognóstico em longo prazo. Outros tipos histológicos menos comuns são o carcinoma medular, o mucinoso, o tubular, o papilífero e o metaplásico. As lesões contidas pela membrana basal do tecido mamário são consideradas lesões *in situ* e devem ser vistas como um processo em evolução, que poderá ser modificado quando novos dados moleculares e genéticos forem incorporados na classificação destas lesões<sup>21</sup>.

Além dos tipos histológicos, vários autores tentaram estratificar os tumores de mama em certos critérios microscópicos. O mais comum é o grau histológico, baseado em uma combinação de características nucleares e arquiteturais, sendo que os tumores de maior grau tendem a ser mais agressivos clinicamente. A importância do grau histológico como fator prognóstico é bem demonstrada, ocorrendo altas taxas de metástases e pior sobrevida em mulheres cujos tumores são categorizados em grau elevado <sup>22</sup>.

O aumento do índice de proliferação celular Ki67 se relaciona com tumores mamários de comportamento clínico mais agressivo. Este índice é verificado por análise imuno-histoquímica do antígeno Ki67, também conhecido como antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki67 (MKI67), um marcador nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular com exceção da fase G0. Assim, é possível quantificar as células que entram no ciclo celular e medir a fração de crescimento. De acordo com o *Consenso de Saint Gallen* (2011), índices de Ki67 superiores a 14% são considerados positivos ou altos, e negativos ou baixos se menores que este valor <sup>23</sup>. Além do uso como recurso prognóstico, o índice Ki67 também tem sido avaliado como ferramenta de predição às terapias oncológicas <sup>24</sup>, como maior sensibilidade ao uso de antracíclicos e taxanos entre os tumores que apresentam altos índices de proliferação celular <sup>25</sup>.

Outros fatores prognósticos e preditivos foram identificados pelo Colégio Americano de Patologistas a fim de orientar o manejo clínico, tais como tamanho tumoral, acometimento axilar, invasão linfática e/ou vascular, *status* dos receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e amplificação ou superexpressão do gene *ERBB2* <sup>26</sup>.

### **3. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA**

Os perfis genômicos demonstram a presença de alguns tipos de tumores mamários com diferentes histórias naturais e comportamentos clínicos. Perou *et al* <sup>27</sup> categorizaram 4 subgrupos de acordo com diferenças na expressão de marcadores moleculares. Os tipos luminais A e B superexpressam genes normalmente relacionados com as células mamárias luminais; o tipo basal expressa tipicamente genes ativos nas células epiteliais basais da mama; e o tipo HER2 foi assim definido devido à superexpressão do receptor do fator de

crescimento epidérmico humano 2<sup>27,28</sup>. Do ponto de vista clínico, as determinações imuno-histoquímicas dos receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP), do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e do

Ki67 são utilizadas como uma aproximação da classificação molecular propriamente dita<sup>29,30,31</sup>, como demonstrado na figura 1.

**Figura 1 – Classificação molecular do câncer de mama.**

LUMINAL A	LUMINAL B
RE + e/ou RP + HER 2 – <b>HER2</b> Ki67 < 14% Mais comum Menos agressivo Bom prognóstico Menos comum Associado com aumento de idade Agressivo	RE + e/ou RP + HER 2 – <b>BASAL</b> Ki67 > 14% RE – RP – HER 2 – Mais frequentemente RE+/RP – Prognóstico Triplo negativo. pior que o Luminal A Ki67 elevado Alta taxa mitótica Citoqueratinas 5/6 + e/ou EGFR + Agressivo

Os tipos moleculares de câncer de mama possuem características clínicas que se associam à expressão imuno-histoquímica de certos marcadores celulares, como os receptores de estrogênio (RE), os receptores de progesterona (RP), os receptores do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2) e o antígeno nuclear Ki67. Adaptado de: PRUNERI, G; BOGGIO, F. Prognostic and predictive role of genetic signatures. In: VERONESI, U; GOLDHIRSCH, A; VERONESI, P; GENTILINI, OD; LEONARDI, MC (Eds.). **Breast cancer: innovations in research and management.** Cham: Springer, 2017. P.121-132.

Os tumores luminais A e B apresentam positividade para receptores hormonais (RE/RP) e são o fenótipo mais comum de câncer de mama, correspondendo a cerca de 70% dos casos<sup>31</sup>. A diretriz da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e do Colégio Americano de Patologistas recomenda que todos os indivíduos diagnosticados com câncer de mama invasivo ou com recorrência tumoral tenham o *status* do RE e do RP determinados. A relação entre expressão dos receptores hormonais e a eficácia da terapia endócrina é bem estabelecida, tratando-se de importante fator prognóstico e preditivo. O diagnóstico de positividade para receptores hormonais é efetuado se >1% de células tumorais apresentam coloração nuclear positiva de intensidade moderada a intensa na imuno-histoquímica<sup>29,31,32</sup>.

Comparado ao luminal A, o tipo luminal B apresenta maior expressão de genes ou proteínas relacionadas à proliferação celular, como *MKI67* e *AURKA*, além de menor expressão de genes ou proteínas luminais, tais como o receptor de progesterona e *FOXA1*. O receptor de estrogênio é expresso similarmente nos dois tipos luminais e apenas ajuda na distinção entre os tipos luminais e não luminais<sup>32</sup>. Os tumores luminais A apresentam menos variantes alélicas

patogênicas no *TP53* (12% versus 29%) e mais variantes alélicas no *PIK3CA* (45% versus 29%) e no *MAP3K1* (13% versus 5%) quando comparados aos luminais B <sup>28</sup>.

O ERBB2 é um receptor tirosina-cinase transmembrânico e membro da família de proteínas ErbB, comumente conhecida como família do fator de crescimento epidérmico (EGFR). O ERBB2 é também denominado HER2 e algumas vezes NEU. A ativação desta classe de receptores celulares é conhecida por aumentar a atividade de várias vias moleculares associadas à progressão e ao crescimento tumoral. O produto do gene *ERBB2* está superexpresso em 18-20% dos cânceres de mama invasivos, acarretando implicações tanto prognósticas quanto preditivas. A avaliação imuno-histoquímica das amostras tumorais fixadas em formol e incluídas em parafina é o método mais empregado na prática clínica a fim de verificar o *status* do HER2, seguindo os pontos de corte do Consenso do Colégio Americano de Patologistas e da Sociedade Americana de Oncologia Clínica <sup>33,34</sup>. Tumores mamários que exibem mais de 10% de células tumorais invasivas e com coloração forte na membrana plasmática marcando toda circunferência da célula são considerados HER2+. Em caso de coloração moderada superior a 10% das células ou forte em menos de 10% das células, a determinação do HER2 é considerada como indeterminada e a amostra deve ser reavaliada por algum método de amplificação gênica <sup>21,30,33,34</sup>.

Até o final do século XX, a superexpressão ou amplificação do *ERBB2* era associada com um fenótipo mais agressivo e pior prognóstico, especialmente naquelas mulheres tratadas com quimioterapia. O prognóstico das portadoras de tumores HER2 melhorou nos últimos anos, devido ao desenvolvimento de terapias-alvo como trastuzumabe e pertuzumabe (anticorpos monoclonais direcionados ao HER2), lapatinibe (inibidor da tirosina-cinase específico do HER2) e T-DM1 (conjugado anticorpo-droga ado-trastuzumabe emtansina) <sup>34,35</sup>.

O *status* HER2 também se mostrou preditivo para benefício de certos regimes quimioterápicos, notadamente aqueles baseados em antracíclicos, possivelmente devido à frequente coamplificação da topoisomerase II nos tumores HER2 <sup>35</sup>.

O tipo basal é caracterizado pela baixa expressão dos genes relacionados aos receptores de estrogênio e HER2, apresentando fenótipo triplo negativo (TN), ou seja, não expressa receptores de estrogênio ou progesterona, nem exibe amplificação do gene *ERBB2*. É associado à expressão tumoral de citoqueratinas 5/6 (CK5/6), P-caderina, p53 e receptor do fator de

crescimento epidérmico (EGFR). Embora a maioria dos tumores TN seja classificada como do tipo basal, os termos TN e basal não são sinônimos. Até 30% dos cânceres TN não preenchem critérios de classificação para o tipo basal quando submetidos à análise de *microarray*, enquanto uma significativa parcela de cânceres basais acaba por expressar RE/RP ou HER2 <sup>36,37</sup>. São considerados um grupo heterogêneo de tumores que compartilham natureza clínica agressiva com maior taxa de recorrência e menor sobrevida nos casos metastáticos, se comparados aos outros tipos moleculares. Apresentam frequência entre 10% a 20% dos todos os cânceres de mama e acometem mulheres de faixa etária mais jovem e de raça negra, geralmente diagnosticadas em estágios mais avançados do que aquelas acometidas pelos demais tipos <sup>38</sup>. A maioria dos tumores TN apresenta classificação histológica de carcinoma ductal invasivo sem outra especificação, embora outros tipos histológicos também sejam observados, como o medular e o metaplásico <sup>37</sup>. Frequentemente apresentam aumento do índice Ki67, alto grau histológico e recorrência mais precoce que os demais subtipos moleculares <sup>38</sup>. Alterações observadas nas vias de reparo do DNA destes tumores incluem perda de função do TP53, RB1 e BRCA1, bem como ativação anômala da via da PI3K/alvo da rapamicina (mTOR), resultando em instabilidade genética e melhor resposta a determinados esquemas quimioterápicos.

Os tumores TN e os basais apresentam considerável sobreposição com os tumores que apresentam mutação do gene *BRCA1*. A dificuldade em se demonstrar uma alteração que seja comum a todos os tumores TN leva à carência de alvos terapêuticos moleculares específicos, sendo atualmente recomendado o tratamento quimioterápico com antracíclicos e taxanos. Estudos têm sido conduzidos para avaliação de novas drogas, tais como os inibidores da poli-ADP-ribose polimerase e da via PI3K/mTOR, com intuito de resgatar os tumores resistentes à quimioterapia convencional <sup>37</sup>. As principais características de cada tipo molecular de câncer de mama podem ser observadas na figura 2.

Tipos moleculares	Luminal A	Luminal B	HER2	TN
% cânceres de mama	40%	20%	10-15%	15 -20%
Expressão de receptores	RE+/RP+		HER2	
Grau histológico	Grau I			Grau III

**Figura 2 – Características clínicas dos tipos moleculares de câncer de mama.**

Os tipos moleculares de câncer de mama apresentam características clínicas diferentes que se refletem no prognóstico. Os tipos luminais são os mais prevalentes, geralmente apresentam baixo grau histológico, expressam receptores hormonais e frequentemente evoluem com prognóstico favorável. Em contrapartida, os tipos TN são menos frequentes, não expressam receptores hormonais e costumam apresentar grau histológico elevado. A maior agressividade dos TN costuma acarretar um prognóstico desfavorável quando comparado aos demais tipos moleculares. Adaptado de WONG, E.; REBELO, J. **Breast Cancer: Breast cancer pathogenesis and histologic vs molecular subtypes.** Disponível em <http://www.pathophys.org/wp-content/uploads/2012/12/breastcancer-copy.png>. Acesso em: 06 setembro 2021.

#### 4. ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O sistema de estadiamento do câncer de mama se aplica tanto ao carcinoma invasivo quanto ao carcinoma ductal *in situ*, com ou sem micro invasão. A confirmação microscópica do diagnóstico é fundamental, devendo se atribuir o tipo histológico e o grau do carcinoma nas avaliações histopatológicas <sup>39</sup>.

O sistema TNM (*Tumor* – tamanho tumoral; *Node* – acometimento de linfonodos regionais; e *Metastasis* - presença de doença sistêmica) do *American College of Surgeons* (Colégio Americano de Cirurgiões) foi desenvolvido em 1959, em uma época sem terapias sistêmicas efetivas e com limitado conhecimento da biologia tumoral. Baseava-se no paradigma vigente à ocasião, no qual a progressão tumoral ocorria para os linfonodos regionais e, de lá, para sítios distantes. Desta forma, a doença inicial seria representada pelos tumores confinados localmente ao órgão, com nenhum ou pouco acometimento regional, enquanto a doença avançada seria representada por acometimento locoregional extenso, ou à distância (doença metastática) <sup>39</sup>.

A possibilidade de metastatização à distância sem haver necessariamente envolvimento regional linfonodal, bem como o desenvolvimento de terapias sistêmicas ao longo das últimas décadas, acarretou mudanças no tratamento do câncer de mama. Os fatores biológicos, tais como grau tumoral, expressão de receptores hormonais e painéis genômicos, se tornaram tão ou mais importantes que a extensão anatômica da doença para definir prognóstico e selecionar uma combinação ótima de terapias <sup>40</sup>. A compreensão atual do câncer de mama é a de um grupo de doenças com diferentes características moleculares que se originam no tecido epitelial da mama, mas possuidora de diferentes prognósticos, padrões de recorrência e de disseminação após o tratamento primário, bem como respostas variadas às

terapias disponíveis <sup>32</sup>.

## 5. COLESTEROL E CÂNCER DE MAMA

O colesterol é um importante constituinte das membranas celulares, regulando sua fluidez e funcionalidade <sup>41</sup>. Além disso, é precursor de metabólitos envolvidos no ciclo celular, de tal modo que sua síntese e captação são aumentados em antecedência ao processo de divisão celular <sup>42</sup>. A síntese de colesterol ocorre a partir de acetil coenzima A, por meio de uma série de reações que têm como enzima-chave a hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGCoAr). O colesterol livre é utilizado para as várias funções celulares e seu conteúdo modula a ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróis (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*; SREBP) <sup>43</sup>.

Por meio da oxidação de sua cadeia lateral, a molécula do colesterol pode ser transformada em óxido de colesterol (OC). Estes exercem relevantes ações que regulam a homeostase lipídica celular, apesar da concentração consideravelmente menor quando comparado a do colesterol <sup>44</sup>.

Os OC são derivados da modificação oxidativa enzimática ou não enzimática da molécula do colesterol. Mono-oxigenases, em especial as da família citocromo P450A, promovem a formação dos OC por via enzimática: 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol (7 $\alpha$ -HC), citocromo P450, família 7, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP7A1); 24HC, citocromo P450, família 46, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP46A1); 25-hidroxicolesterol (25HC), colesterol 25-hidroxilase (CH25H); e 27HC, citocromo P450, família 27, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP27A1) <sup>45</sup>.

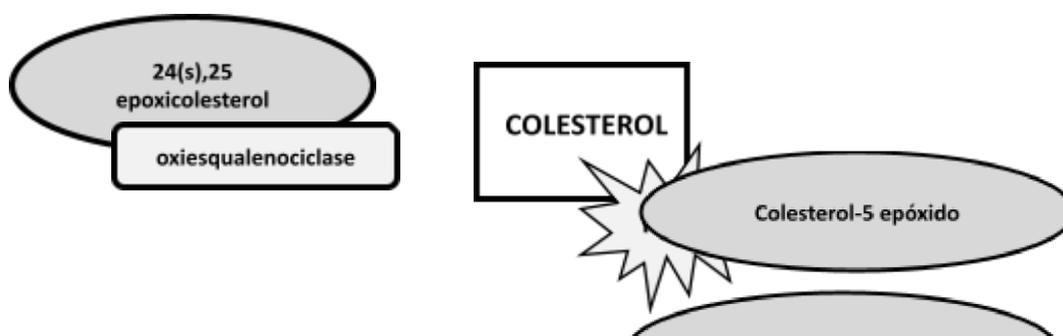
A dupla ligação do colesterol no anel B favorece sua oxidação espontânea por espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species - ROS*), contribuindo para a oxidação do colesterol na posição C7. O 7 $\beta$ -hidroxicolesterol (7 $\beta$ -HC) e o 7-cetocolesterol representam os principais produtos desta via, como demonstrado na figura 2.

OS OC modulam a ativação da SREBP, por se ligarem à proteína gene 1 induzido por insulina (INSIG) e fortalecerem a ancoragem da SREBP na membrana do retículo endoplasmático. Esta ação inibe a ativação da SREBP no complexo de Golgi, evitando sua migração ao núcleo e, portanto, sua ação sobre a transativação de genes que aumentam a síntese

e a captação celular de lípidos. Inversamente, em condições de depleção de esteróis intracelulares, a SREBP é clivada no complexo de Golgi e sua porção ativa liga-se à unidade promotora de genes que codificam para o receptor da lipoproteína de densidade baixa, LDL (*LDLR*) e HMGCoAr (*HMGCOAR*). Em consequência, ocorre o aumento da captação de LDL e a síntese de colesterol a partir de acetato <sup>41</sup>, o que impede oscilação em sua concentração intracelular.

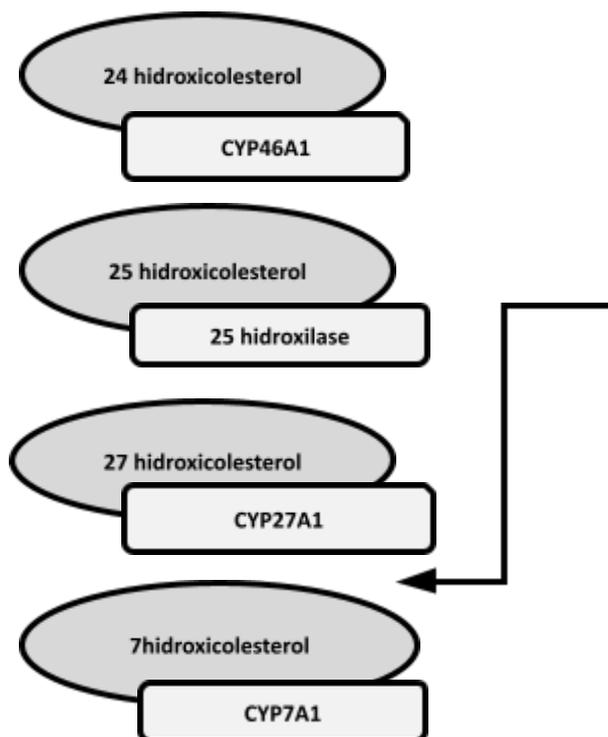
A manutenção da concentração intracelular de colesterol é fundamental, uma vez que o colesterol livre se difunde entre as membranas celulares, exercendo ação inflamatória e citotóxica. A deposição anormal de colesterol livre na membrana do retículo endoplasmático está diretamente relacionada aos efeitos tóxicos do colesterol, podendo desencadear estresse do retículo endoplasmático, ativação proteossomal e expressão de caspases relacionadas à morte celular por apoptose. Além disso, o excesso de colesterol pode levar à formação de OC tóxicos, como o 7- cetocolesterol, que exerce importante efeito inflamatório e apoptótico <sup>41,44</sup>.

Figura 3 – Formação dos óxidos de colesterol por meio de vias enzimáticas e não enzimáticas.



## VIAS ENZIMÁTICAS

## VIAS NÃO ENZIMÁTICAS



Os óxidos de colesterol (OC) podem ser formados por vias enzimáticas, em especial pela ação das enzimas da família citocromo P450A, resultando na formação de 24 e 25 hidroxicolesterol, entre outros produtos; e também pela via não enzimática, por meio da oxidação da cadeia lateral da molécula do colesterol por espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando principalmente na formação de 7-cetocolesterol e 7 beta-colesterol. 7alfa-hidroxicolesterol pode ser formado pelas duas vias. Adaptado de BJÖRKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest*, v. 110, n.6, p.725-730, 2002. Disponível em <https://doi.org/10.1172/JCI16388>. Acesso em 10 Fev 2019.

Uma fração do colesterol livre é armazenada no citosol na forma de colesterol esterificado, graças à ação da enzima esterol O-aciltransferase (SOAT) ou acilcolesterol aciltransferase (ACAT). Devido à sua maior hidrofobicidade e ponto de fusão, o colesterol esterificado cristaliza-se no citosol, ficando em forma relativamente inerte. Por meio da atividade da enzima colesterol éster hidrolase neutra, o colesterol esterificado é reconvertido à sua forma livre e biotiva <sup>44</sup>.

A concentração intracelular de colesterol é ainda determinada pela exportação do excesso de colesterol livre para aceptores extracelulares, como apolipoproteína (apo) A-I e HDL. Este processo, denominado efluxo de colesterol, representa a primeira etapa do transporte reverso de colesterol, sistema que favorece o trânsito de colesterol das células periféricas ao fígado, onde o mesmo pode ser eliminado na bile e excretado nas fezes <sup>44</sup>.

Óxidos de colesterol, como 22, 24 e 27- hidroxicolesterol, são ligantes do receptor X hepático (*liver X receptor*; LXR), o qual ao se dimerizar com o receptor X de ácido retinoico (*retinoic X receptor*; RXR) promove a transcrição dos genes *ABCA1* e *ABCG1*. Estes codificam para as proteínas de membrana celular, transportador cassete de ligação ao trifosfato de adenosina, subfamília ABCA, membro 1 (ABCA-1; *ATP binding cassette transporter A-1*) e transportador cassete de ligação ao trifosfato de adenosina, subfamília ABCG, membro 1 (ABCG-1; *ATP binding cassette transporter G-1*), que atuam, respectivamente, como receptores de apoA-I e de grandes partículas de HDL, especialmente as HDL<sub>2</sub>. A interação de ABCA-1 e G-1 com seus ligantes favorece a hidrólise de moléculas de ATP ligadas à estrutura destes transportadores, fornecendo energia necessária para translocação do excesso de colesterol livre celular através dos folhetos de membrana plasmática para os aceptores extracelulares <sup>41</sup>. O efluxo de colesterol celular impede o acúmulo de colesterol em células com elevada demanda de colesterol, em especial macrófagos, envolvidos em processo de aterogênese e inflamação. Além disto, células em processo de replicação aumentam a captação de LDL, o que facilita o processo de divisão celular. Neste aspecto, a remoção do excesso de colesterol em células tumorais, promovida pelas HDL, pode representar um mecanismo importante de controle intracelular do colesterol e de outras ações locais exercidas por estas partículas, como inibição da inflamação, apoptose e oxidação, entre outras <sup>41</sup>.

O 27-hidroxicolesterol (27HC) apresenta maior solubilidade em meio aquoso quando comparado ao colesterol e sua produção intracelular pode representar rota adicional ao transporte reverso de colesterol. Há indícios de que este OC seja transportado na circulação pelas HDL. Além disso, os OC também são transportados pelas LDL e, juntamente com a modificação de ácidos graxos e apoB, contribuem para a oxidação da partícula e seu potencial aterogênico. Nas LDL, os principais OC são representados pelo 7-cetocolesterol, 7beta-hidroxicolesterol, 7alfa-hidroxicolesterol e 5beta, 6beta-epóxi de colesterol <sup>46</sup>.

Embora várias espécies de OC modulem favoravelmente a exportação celular de lípidos, HDL enriquecidas em OC apresentam menor capacidade de remover colesterol celular <sup>47</sup>. O acúmulo de 7-cetocolesterol nas células altera domínios da membrana plasmática e reduz a remoção de colesterol pela apoA-I <sup>48</sup>. Redução no conteúdo dos transportadores ABCA-1 e ABCG-1 foi observada em macrófagos expostos ao 7-hidroperoxicolesterol, o que foi acompanhado pelo prejuízo no efluxo de colesterol <sup>49</sup>.

## 5.1. ÓXIDOS DE COLESTEROL, HDL E CÂNCER DE MAMA

Alterações no metabolismo lipídico seriam fatores de risco independentes para o câncer de mama <sup>16</sup>, especialmente as alterações relacionadas ao metabolismo do colesterol. A hipercolesterolemia, comumente associada à obesidade, emergiu como fator de risco adicional para o câncer de mama na pós-menopausa <sup>50</sup>. Um estudo prospectivo conduzido na Coreia do Sul, onde os índices de hipercolesterolemia e câncer de mama têm aumentado, seguiu mais de 170.000 mulheres na pós-menopausa durante 10 anos para avaliar a relação entre colesterol plasmático e risco de câncer de mama. Foi verificado que mulheres com aumento das concentrações plasmáticas de colesterol tinham elevação de 31% no risco de desenvolver câncer de mama quando comparadas às mulheres com concentrações mais baixas, especialmente quando o IMC era normal. Não foi possível avaliar a ingestão dietética de colesterol nesse estudo, nem os perfis moleculares dos cânceres diagnosticados <sup>51</sup>. Outro estudo avaliou retrospectivamente a relação entre o colesterol da dieta e todos os tipos de cânceres, tendo observado aumento de 48% no risco de câncer de mama entre mulheres menopausadas que consomem quantidades elevadas de colesterol. Contudo, dados obtidos por meio de questionários alimentares podem apresentar vieses de recordação <sup>52</sup>. Interessantemente, há pouca evidência na literatura associando a hipercolesterolemia familiar (primária) ao câncer de mama.

Na pré-menopausa, concentrações mais baixas de colesterol na lipoproteína de densidade alta (HDLc) se associaram com risco de câncer de mama. O estudo ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) acompanhou uma coorte de 7.575 mulheres durante 13 anos e observou 359 casos de câncer de mama. Concentrações menores de HDLc (<50 mg/dL) no início do estudo foram associadas com concentrações mais altas de triglicérides (TG) e maior IMC. Especificamente, a associação entre valores baixos de HDLc e incidência de câncer de mama foi observada apenas entre as mulheres pré-menopausadas (HR=1,67; IC95% 1,06-2,63). Contudo, a utilização de um ponto de corte para o HDLc com base na estratificação de risco cardiovascular pode não ter significado biológico quanto ao risco de câncer de mama, dificultando as análises. Outras limitações, como ausência de informações sobre rastreamento, tipo e estágio de câncer de mama, pequeno número de casos de câncer de mama nas mulheres pré-menopausadas e exclusão da população hispânica e oriental, podem ter

impactado as conclusões <sup>53</sup>. Em um estudo caso-controle com 690 casos e 1380 controles foi evidenciado que concentrações elevadas de HDLc ( $\geq 60$  mg/dL) se associaram com redução do risco de câncer de mama na pré-menopausa [OR IC95% CI 0,49 (0,33-0,72),  $P < 0,01$ ] em mulheres com baixo IMC. Concentrações reduzidas de HDLc ( $<50$  mg/dL) e elevadas de TG ( $\geq 150$  mg/dL) foram associadas com aumento do risco para tumores RE negativos (OR 2,20; IC95% 1,32 -3,67). O pequeno número relativo de mulheres não obesas na pré-menopausa pode ter limitado o poder deste estudo. Outra limitação pode ser devido à causação reversa entre estado menopáusico e os diferentes quadros clínicos, uma vez que os tumores incidentes na pré-menopausa tendem a ser mais agressivos e com taxas de proliferação celular mais elevadas <sup>54</sup>.

Diferentes modelos animais foram utilizados para demonstrar associações entre dietas ocidentais hiperlipídicas ricas em colesterol (*Western diets*) e o crescimento tumoral no câncer de mama <sup>50,55</sup>. Usando modelo hiperlipidêmico com camundongos *knockout* para apoE (apoE  $-/-$ ), os autores injetaram células Mvt-1 no coxim gorduroso mamário de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica e rica em colesterol. Os autores demonstraram que os animais apoE  $-/-$  desenvolveram tumores maiores e mais metástases pulmonares quando comparados aos animais selvagens normolipidêmicos <sup>55</sup>. No entanto, dietas ricas em lípides não alteram as concentrações plasmáticas de colesterol em camundongos, dificultando análises sobre o impacto do colesterol na biologia tumoral. Utilizando modelos animais transgênicos de adenocarcinoma mamário espontâneo MMTV-pyMT (*murine mammary tumor virus-driven polyoma middle T antigen*), Nelson *et al* <sup>56</sup> observaram aumento nas taxas de proliferação tumoral e na carga tumoral associado ao aumento de aporte do colesterol na dieta, sendo que esses efeitos promotores foram inibidos pela administração de estatinas. Esses achados evidenciam a patogenicidade do colesterol em modelos animais de câncer de mama e indicam que o impacto de dieta hiperlipídica nesse câncer pode ser atribuído ao aumento da produção de colesterol <sup>16</sup>.

Estudos sugerem a ligação entre obesidade, metabolismo do colesterol e a patogênese do câncer de mama, tendo como base fisiopatológica a ação do 27HC <sup>16</sup>. O 27HC - óxido derivado da modificação enzimática do colesterol pela enzima do complexo citocromo P450, 27alfa-hidroxilase (CYP27A1) - atua como um modulador seletivo do receptor de estrógeno <sup>41</sup>, o que sugere sua participação na biologia de tumores hormônio-

sensíveis<sup>57</sup>. A concentração plasmática de colesterol correlaciona-se positivamente com o 27HC, OC mais abundante na circulação<sup>41</sup>. As estatinas diminuem a expressão da CYP27A1 em células tumorais e reduzem a concentração de 27HC, podendo tornarem-se uma opção complementar à terapia padrão<sup>58</sup>.

No câncer de mama RE+, a concentração de 27HC interferiu negativamente na evolução da doença, favorecendo o crescimento tumoral e o potencial metastático. Em biópsias obtidas de tumores de mama humana, observou-se que o estadiamento tumoral correlacionou-se, positivamente, com a expressão da CYP27A1, enzima que promove a síntese deste OC. Mulheres com tumor de mama RE+ apresentam maior concentração de 27HC em tecido saudável da mama e, ainda maior, no tecido tumoral em comparação às mulheres saudáveis. A sobrevida daquelas mulheres parece relacionada à expressão da CYP7B1, enzima que metaboliza o 27HC<sup>59</sup>.

A dieta rica em gordura aumenta a concentração plasmática de 27HC e o crescimento tumoral em camundongos dislipidêmicos, após transplante de células de tumor de mama, em comparação aos animais em dieta padrão. Este efeito foi prevenido pelo tratamento com estatina ou inibição farmacológica da CYP27A1<sup>56</sup>. O 27HC também promoveu a angiogênese em células tumorais de duas maneiras independentes, por meio da via clássica de sinalização (RE alfa/VEGF) e da via das espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen specimens- ROS*)<sup>60</sup>.

A biossíntese de 27HC ocorre também nas células tumorais, mas principalmente nos macrófagos que infiltram o tecido neoplásico. Nestas células, a expressão de CYP27A1 é elevada, o que promove a formação de 27HC, especialmente na vigência de alta concentração intracelular de colesterol<sup>61</sup>.

Na circulação, o 27HC é transportado na forma esterificada, principalmente pelas lipoproteínas de densidade alta (HDL)<sup>62</sup>. A concentração plasmática de 27HC é positivamente associada com a de colesterol total<sup>63</sup> e parece refletir o balanço positivo de colesterol no organismo. Maior concentração circulante de 27HC é observada em indivíduos com redução importante do HDLc, o que tem sido atribuído como mecanismo de compensação à redução na remoção de colesterol celular pelas HDL. O 27HC, por sua maior solubilidade pela membrana plasmática, representa mecanismo alternativo que pode garantir a exportação do excesso de esteróis das células<sup>64</sup>.

Conforme exposto acima, as HDL removem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos, impedindo seu acúmulo intracelular. O conceito de transporte reverso de colesterol em células tumorais é um aspecto pouco explorado na literatura, mas que pode se refletir na redução do conteúdo de lípidos, necessários à proliferação do tumor. Em células de tumor de mama da linhagem MCF-7, o tratamento com agonistas do receptor nuclear LXR aumenta a expressão de ABCG-1 e o efluxo de colesterol dessas células para as HDL, com menor proliferação celular e maior indução de apoptose <sup>65</sup>.

A menor expressão de ABCA-1 em tumor de mama humana é associada a um fenótipo mais agressivo e a um pior prognóstico <sup>66</sup>. Por outro lado, a maior expressão de ABCA1 foi determinante ao fenótipo lipídico em células de tumor de mama e a expressão diferencial de genes relacionados ao metabolismo lipídico parece conferir potencial metastático em várias linhagens de tumor de mama <sup>67</sup>.

Diversos estudos demonstram uma associação inversa entre a concentração plasmática de HDLc e o desenvolvimento de câncer de mama, embora alterações na funcionalidade da partícula de HDL possam explicar resultados contraditórios na literatura <sup>53,68</sup>. Valores basais reduzidos de HDLc associam-se a um pior prognóstico em mulheres portadoras de tumor TN <sup>69</sup>

. HDL isoladas de portadoras de câncer de mama com diabetes mellitus, facilitam a adesão de células tumorais ao endotélio vascular, o que é implicado com o potencial metastático do tumor <sup>70</sup>. Além disso, como a inflamação também é associada às neoplasias, existem evidências de que a HDL, diretamente, afetaria o processo inflamatório, e a inflamação afeta a funcionalidade da HDL, favorecendo novas percepções sobre o papel multifuncional desta partícula <sup>71</sup>.

A diminuição da concentração plasmática de HDLc também se associou com maior risco de câncer de mama <sup>50</sup>. Outros estudos sugerem que a funcionalidade da partícula de HDL seria mais relevante do que as concentrações plasmáticas de HDLc, refletindo o dinamismo das várias ações integradas desta lipoproteína. Cabe ressaltar que as HDL apresentam propriedades biológicas variadas, incluindo o transporte reverso de colesterol, inibição da inflamação e oxidação, estímulo à vasodilatação e melhora do metabolismo glicídico, entre outras <sup>71</sup>. Apesar das evidências relacionarem alterações do metabolismo do

colesterol com o câncer de mama, a literatura ainda carece de uma explicação mais robusta sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos <sup>72</sup>.

Estudos avaliando medicamentos que visam à redução da concentração de colesterol plasmático por meio da inibição da HMGCoAr, como as estatinas, apresentaram resultados conflitantes, não sendo possível comprovar efeito na prevenção do câncer de mama <sup>16</sup>. Os resultados de uma meta-análise recente não mostraram associação entre o uso de estatina e a incidência de câncer de mama. Foram incluídos 36 estudos observacionais contemplando 121.399 indivíduos, com dados sobre os níveis de exposição e os dados dos desfechos. O risco estimado de câncer de mama em mulheres em uso de estatinas foi 0,94 (IC 95% 0,86-1,03) com significativa heterogeneidade entre as estimativas ( $I^2 = 83,79\%$ ,  $p = 0,0001$ ), não se observando diferenças mesmo quando realizada estratificação por região, duração do tratamento com estatina, metodologia do estudo, propriedades farmacológicas da estatina ou uso individual da mesma <sup>20</sup>.

No estudo WHI (*Women's Health Initiative*) foi observada associação entre estatina e tumores RE+, sendo que o uso prévio de estatinas foi associado ao diagnóstico de câncer de mama em estágios menos avançados. Estatinas eram usadas por 10.474 mulheres (8%) no início da observação. Usando um modelo multivariado tempo-dependente, o uso das estatinas lipofílicas foi associado com redução no diagnóstico de câncer de mama em estágios avançados (RR 0,80; IC 95% 0,64-0,98), significativo entre mulheres com doença RE+ (RR 0,72; IC 95% 0,56-0,93). A mortalidade por câncer de mama foi menor nas usuárias de estatinas quando comparadas às não usuárias (RR 0,59, IC 95 % 0,32-1,06), embora não estatisticamente significativa <sup>73</sup>. Contudo, estudos observacionais nem sempre esclarecem se a associação epidemiológica observada é um efeito causal ou apenas o resultado de alguma variável de confusão não avaliada; outrossim, mais estudos são necessários <sup>20</sup>.

Em compensação, as estatinas lipofílicas parecem reduzir o risco de recidiva do câncer de mama, como demonstrado por Ahern *et al* <sup>74</sup>. Foi realizado um estudo prospectivo que avaliou a associação entre estatina e recorrência de câncer de mama. Os pesquisadores incluíram mulheres com diagnóstico de câncer de mama invasivo, estágios de I a III, que foram seguidas por mediana de 6,8 anos após o diagnóstico. Mulheres em uso de sinvastatina apresentaram risco de recorrência reduzido (diferença de risco ajustada para 10 anos = -0,10; IC 95% = -0,11 a -0,08). Não se observou neste estudo associação entre uso de estatinas hidrofílicas e risco de

câncer de mama (diferença de risco ajustada para 10 anos= 0,05; IC 95%= -0,01 a 0,11) <sup>74</sup>. Em outro estudo, 1.945 sobreviventes de câncer de mama em estágios iniciais recrutadas do *Life after Cancer Epidemiology Study* foram seguidas por cerca de cinco anos. Os casos de recorrência de câncer de mama, bem como o uso de estatinas, foram obtidos de bancos de dados americanos (*KPNC Cancer Registry* e *Utah Cancer Registry*). O tempo médio de uso da estatina foi de 1,96 anos e 97,8% das mulheres utilizaram estatinas lipofílicas. Foram observados 210 casos de recorrência, sendo o risco de recorrência menor no grupo que utilizou estatina (RR 0,67; IC 95% 0,39-1,13), sugerindo um papel protetor das estatinas<sup>19</sup>. É importante salientar que os riscos que levam ao desenvolvimento do câncer de mama podem não ser necessariamente os mesmos implicados na recorrência <sup>74</sup>.

A concentração plasmática de OC foi avaliada prospectivamente em mulheres com câncer de mama invasivo, metastático ou não, RE+/RP+ e HER2 negativo, antes e após um mês de terapia hormonal (estudo OXYTAM). O tamoxifeno foi prescrito para 15 voluntárias e os inibidores de aromatase (letrozol e exemestano), para 14. Antes do início da terapia, a concentração de 25HC, também sugerido como um promotor tumoral, foi maior em mulheres com tumores metastáticos em comparação aos não metastáticos. O uso de tamoxifeno reduziu as concentrações de 24HC, 7alfa e 25HC e aumentou a de 4beta hidroxicolesterol, em comparação ao inibidor de aromatase. As concentrações de 27HC aumentaram após o uso de inibidor de aromatase, mas não após o tamoxifeno. Assim, o aumento do 27HC durante o tratamento hormonal com inibidores de aromatase poderia ter um impacto negativo no desenvolvimento tumoral e na eficácia do tratamento, devido às propriedades promotoras tumorais do 27HC nos tumores RE+. Assim, foi sugerido que alguns OC poderiam servir como biomarcadores de prognóstico e/ou de predição da eficácia da hormonioterapia <sup>75</sup>.

A promoção do câncer e a resistência aos tratamentos na presença de concentrações elevadas de OC também foi descrita. O 25HC aumentou a proliferação celular em células de câncer de mama da linhagem MCF7 por meio da indução dos genes transcritores do RE alfa <sup>76</sup>. A presença do 25HC pode estar associada à resistência aos inibidores da aromatase, fármacos utilizados no tratamento dos cânceres de mama que expressam RE e/ou RP, ao agir como um modulador seletivo do receptor de estrogênio (*selective estrogen receptor modulator-SERM*) estimulando os receptores hormonais tumorais <sup>77</sup>.

Outros OC desempenham relevante papel na biologia tumoral. O 7-hidroxicolesterol e o 7-cetocolesterol foram identificados como marcadores de estresse oxidativo *in vivo* e concentrações aumentadas de 7-hidroxicolesterol foram observadas em mulheres com câncer e inflamação, podendo ser fatores de risco para pior desfecho na terapia oncológica. Ainda, há evidência de que o acúmulo intracelular de 7-cetocolesterol pode aumentar o efluxo da doxorubicina, agente quimioterápico utilizado no tratamento do câncer de mama, devido ao aumento de transportadores da família ABC, com consequente diminuição dos efeitos citotóxicos da droga e falha no tratamento <sup>78</sup>.

Os efeitos dos OC são heterogêneos possivelmente devido a existência de vários receptores presentes nos tumores, bem como devido à possibilidade de o colesterol ser convertido em espécies de OC com propriedades tumorigênicas ou não. Os OC também podem afetar o fenótipo das células do sistema imune que infiltram o microambiente tumoral, resultando em novas perspectivas sobre o papel desempenhado pelos OC no metabolismo tumoral <sup>79</sup>. Recentemente foi demonstrado que os derivados do colesterol podem regular o reconhecimento ou o escape imunológico das células do microambiente tumoral e assim desempenhar um papel crítico na vigilância imunológica do câncer <sup>79</sup>.

## 6. JUSTIFICATIVA

Os tumores mamários malignos podem expressar ou não RE e/ou RP, além do receptor ERB2 (HER2), com implicações prognósticas e terapêuticas reconhecidas para cada tipo molecular. A evolução clínica das neoplasias mamárias tende a seguir a história natural de cada tipo molecular, embora os fatores prognósticos clássicos nem sempre sejam suficientes para compreender o comportamento de cada caso, como as recidivas. Estudos sugerem uma ligação entre o perfil de lípides e lipoproteínas plasmáticas com o câncer de mama, especialmente em neoplasias luminais. A maior parte das evidências corroboram o papel protetor da HDL (representado pela métrica do HDLc) contra o câncer de mama, embora não haja evidências acerca de alteração na composição e funcionalidade desta lipoproteína nos diferentes tipos moleculares e estágios da doença. A HDL remove o excesso de colesterol celular, limitando a biodisponibilidade deste esterol para a replicação e o crescimento tumoral. Além disso, carrega OC, como 27HC e 25HC, vinculados à proliferação e metástase de tumores de mama. No presente estudo, foi explorada a hipótese de que a capacidade da HDL de remover colesterol celular e transportar óxidos de colesterol pudesse ser diferente entre mulheres saudáveis e portadoras de câncer de mama, de acordo com os estágios da doença e tipos moleculares. Para tanto, a determinação dos lípides plasmáticos, da composição e funcionalidade da HDL foram determinados em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama, virgens de tratamento e comparadas com mulheres do grupo controle, por idade e índice de massa corporal (IMC), procurando limitar os vieses relativos à componentes metabólicos e terapêuticos. Os resultados poderão auxiliar na compreensão do papel da HDL na evolução do câncer de mama, podendo sugerir novos pontos de interesse para diagnóstico, seguimento e terapêutica.

## 7. OBJETIVOS

Avaliar em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama invasivo, isentas de tratamento, em comparação com controles:

- a concentração de lípides plasmáticos;
- a composição a partícula de HDL em óxidos de colesterol, colesterol total, triglicérides, fosfolípidos e apoA-I;
- a capacidade da HDL em remover <sup>14</sup>C-colesterol de macrófagos; e

- a associação entre os parâmetros descritos acima com a classificação molecular do tumor e estágio da doença.

## 8. MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1. CASUÍSTICA

Estudo de coorte transversal, onde foram incluídas 201 mulheres, entre 18 e 80 anos de idade, com diagnóstico recente de câncer de mama invasivo, virgens de tratamento, com quaisquer estágios clínicos e com classificação molecular do tumor. Cento e cinquenta e sete mulheres sem diagnóstico de câncer de mama foram incluídas como grupo controle. Não foram incluídas mulheres portadoras de diabetes mellitus, doença renal crônica (taxa de filtração glomerular estimada  $< 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>), doenças autoimunes e imunossupressoras, tabagistas, etilistas, em uso de anticoncepcionais hormonais ou terapia hormonal, gestantes, com história prévia de câncer ou com doença *in situ*. Portadoras de câncer de mama foram recrutadas no Hospital Pérola Byington e as mulheres saudáveis, na Universidade Nove de Julho, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e na Unidade Básica de Saúde Dra. Ilza Weltman Hutzler. Após exclusão das voluntárias por não atenderem aos critérios de elegibilidade, 150 mulheres foram incluídas no grupo controle e 186 no grupo câncer de mama. Todas as participantes foram incluídas no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (#3.139.460; fevereiro de 2019), Centro de Referência da Saúde da Mulher (Hospital Pérola Byington; #3.225.220; março de 2019) e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#3.317.909, março de 2019).

### 8.2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

A classificação molecular do tumor foi obtida do prontuário médico junto ao Hospital Pérola Byington. As análises dos tipos moleculares foram realizadas por imunohistoquímica, após amostragem do tecido tumoral obtida por biópsia percutânea ou cirúrgica das voluntárias, segundo os critérios do Colégio Americano de Patologistas. Foram consideradas amostras positivas para receptores hormonais aquelas em que  $>1\%$  de células tumorais apresentaram coloração nuclear positiva de intensidade moderada a intensa na imunohistoquímica. Em relação à classificação dos tumores HER2, foram consideradas HER2+ as amostras que exibiram  $> 10\%$  de células tumorais invasivas e com

coloração forte na membrana plasmática marcando toda circunferência da célula. Em caso de coloração moderada > 10% das células ou forte em < 10% das células, a amostra foi reavaliada por hibridização *in situ*, sendo considerado positiva se a razão HER2/centrômero fosse > 2,0; ou razão HER2/centrômero < 2,0 com média de HER2 > 6 sinais por célula (maior que 120 sinais em 20 núcleos)<sup>21,31,33</sup>.

### 8.3. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE PLASMA E DOSAGENS BIOQUÍMICAS

De ambos os grupos, foram colhidos 15 mL de sangue, por punção venosa, após jejum de 12 h. O plasma foi, imediatamente, obtido por centrifugação a 4°C, 20 min, 3000 rpm. Para obtenção da fração de plasma que contém apenas a HDL, as lipoproteínas que contêm apoB (VLDL e LDL) foram precipitadas por meio da adição de solução de sulfato de dextrana/cloreto de magnésio (1:1) ao plasma (100 µL/mL). Após incubação a temperatura ambiente por 30min, o plasma foi isolado mediante centrifugação, durante 20 min, 3000 rpm. As amostras de plasma total e plasma contendo apenas HDL foram mantidas a -80°C. Os lípides plasmáticos e na fração isolada de HDL [colesterol total (CT), HDLc, triglicérides (TG) e fosfolípidos (FL)] foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos (Labtest do Brasil, MG, Brasil e Wako Diagnostics, Mountain View, CA, EUA). A concentração de LDLc foi determinada pela fórmula de Friedewald<sup>80</sup>, a de VLDLc, pela razão TG/5 e não HDLc, pela subtração CT - HDLc. Índices aterogênicos foram determinados por meio da razão TG/HDLc e CT/apoB, os quais refletem a formação de LDL pequenas e densas.

### 8.4. ISOLAMENTO DA HDL

A HDL (D = 1.063 – 1.21 g/mL) foi isolada do plasma por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade<sup>81</sup>, ajustando-se a densidade com brometo de potássio para 1.21 g/mL. Após diálise contra solução de tampão fosfato contendo EDTA, foi armazenada em solução de sacarose 5% a -80°C. A apoA-I foi determinada por imunoturbidimetria (Randox Laboratory Ltd.)

## 8.5. QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDOS DE COLESTEROL NA HDL

A concentração dos OC (24HC, 25HC e 27HC) foi determinada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010) utilizando a versão 2.5 do software *GCMS solution*. Foram utilizados isótopos deuterados como padrões internos, o que torna o método mais sensível e específico, pois corrigem as perdas que podem ocorrer no processo <sup>82</sup>. Amostras de plasma (0,5 mL) foram misturadas com quantidades conhecidas dos padrões internos deuterados e antioxidante, hidroxitolueno butilado (BHT; 50µg/mL).

Para a hidrólise dos ésteres de óxidos de colesterol, as amostras foram saponificadas, com 0,4M de hidróxido de potássio (KOH) em etanol, por 2 h em temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram purificadas por extração líquido-líquido, com adição de 100 µL de ácido fosfórico, 20 mL de clorofórmio e 6 mL de água, seguindo-se centrifugação a 2000 rpm durante 15 min. A fase superior foi descartada e a fase orgânica evaporada e redissolvida em tolueno. Na última fase de purificação, os óxidos de colesterol foram separados do colesterol por meio de extração em fase sólida (coluna Supelclean™ LC-Si SPE Tube). Os esteróis foram derivatizados com solução silanizante, composta por 100 µL de piridina e 100 µL de N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (1:1, v/v) (Supelco 33155-U) e incubados por 1 h a 60°C.

Um microlitro da amostra derivatizada foi injetada no cromatógrafo por injetor automático em modo de injeção *splitless*. A separação foi realizada em coluna capilar Restek (100% dimethyl polysiloxane - Rxi13323) 1ms, 30 m de comprimento, diâmetro interno 0,25 mm, por 30 min, usando hélio como fase móvel, com velocidade linear constante de 44.1 cm/s. O forno foi iniciado em 240°C com incremento de 5°C/min por 7 min até 290°C. O espectrômetro de massa foi operado modo de elétron de impacto a uma voltagem de ionização de 70eV com a temperatura da fonte de íons e da interface a 300°C. Os íons dos esteróis foram identificados e monitorados no espectrômetro de massa pelo método SIM (Single Ion Monitoring - monitoramento do íon selecionado). A quantificação pelo GC-MS/SIM foi feita pela comparação com as áreas dos picos e os espectros de massa da curva padrão de íons com correção pelos padrões internos deuterados. A precisão do

procedimento de extração e quantificação dos OC foi determinada pelo coeficiente de variação de 6 dosagens da mesma amostra de plasma.

## 8.6. ACETILAÇÃO DE LDL

Lipoproteínas de densidade baixa (LDL) foram isoladas de *pool* de plasma obtido de doares saudáveis, por meio de ultracentrifugação sequencial e purificação em gradiente descontínuo de densidade. A LDL foi acetilada segundo protocolo descrito por Basu *et al.*<sup>83</sup> Para cada 16 mg de proteína de LDL, foi adicionado 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de cloreto de sódio (NaCl 0,15 M), sob constante agitação e banho de gelo. Anidrido acético em pequenas e múltiplas quantidades foi adicionado por um período de 1 h, seguido de 30 minutos de agitação em banho de gelo. O volume de anidrido acético utilizado foi de 1,5 vezes a massa de proteína de LDL. A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra tampão fosfato (PBS) com EDTA (pH = 7,4) por 24 h a 4°C e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry *et al.*<sup>84</sup>

## 8.7. REMOÇÃO DE <sup>14</sup>C-COLESTEROL DE MACRÓFAGOS MEDIADA PELA HDL

Os protocolos realizados com modelo animal encontram-se de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA #7070120821). Foram utilizados macrófagos diferenciados de células obtidas da medula óssea (BMDM) de camundongos C56BL6B de ambos os sexos entre 6 a 48 semanas de idade. Os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de sobredose da associação de cloridrato de cetamina (300 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (30 mg/kg de peso corporal), de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI).

Fêmur e tibia de ambos os membros foram dissecados para obtenção de células indiferenciadas. As extremidades dos fêmures e tíbias foram seccionadas e a medula óssea lavada com meio DMEM contendo antibióticos, soro fetal bovino e meio condicionado, advindo de células L929. A medula foi gentilmente aspirada com dissolução dos agregados celulares. As

células foram centrifugadas (1000 rpm, 6 min, temperatura ambiente) e semeadas em placas de cultura com incubação em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub>, por 5 d. O meio de cultura foi trocado por novo meio condicionado, o que auxilia no crescimento e diferenciação. No sexto dia, as células foram incubadas com DMEM com baixa concentração de glicose, contendo 10% de FCS. Após confluência, os macrófagos foram incubados com DMEM (*Low Glucose*, Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescido com 50 µg de LDL acetilada/mL e 0,3 µCi de <sup>14</sup>C-colesterol/ mL (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 48 h.

Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato (PBS - NaCl 150 mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L - pH 7,4) contendo FAFA, as células foram tratadas, por 18h, com DMEM/FAFA para garantir o equilíbrio do pool intracelular de colesterol radioativo. Após lavagem com PBS/FAFA, as células são incubadas com HDL isoladas (50 µg/mL), por 6 h. O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, para remoção de debris celulares e transferido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora (Perkin Elmer, Turko, Finlândia). Os poços das placas foram lavados com solução fisiológica gelada (4°C) por 2 vezes. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a radioatividade determinada após evaporação do solvente. As células foram incubadas com 250 µL de NaOH 0,2 N, durante 3 h, a temperatura ambiente, seguindo-se a determinação da concentração de proteína. O efluxo específico mediado pela HDL ou soro foi subtraído daquele obtido com incubações apenas com DMEM/FAFA (efluxo

---

<sup>14</sup>C-colesterol no meio + <sup>14</sup>C-colesterol na célula

## 8.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados e organizados em dois grupos: o grupo controle, formado por mulheres saudáveis; e o grupo câncer de mama, formado por mulheres

basal). A porcentagem de efluxo de colesterol foi calculada como: <sup>14</sup>

$$\frac{\text{C-colesterol no meio}}{\text{C-colesterol no meio}} \times 100$$

diagnosticadas com neoplasia maligna de mama. Ambos foram caracterizados quanto à idade, IMC, estado menopáusicos, presença de dislipidemia e de hipertensão arterial. O grupo câncer de mama também foi caracterizado em relação ao estágio clínico inicial da doença, presença de antecedentes familiares para neoplasia de mama, tipo histológico e tipo molecular.

Foram realizados os testes de normalidade (*Shapiro-Wilk*) com representação gráfica das variáveis analisadas. Os dados paramétricos foram representados por média e desvio padrão da amostra e comparados pelo teste t de *Student*, com ou sem a correção de *Welch*, dependendo da performance do Teste de *Levene* quanto à esfericidade da amostra. Ao avaliar mais de duas amostras foi empregada análise de variância de medidas não repetidas com pós-teste de *Tukey* ou de *Games-Howell*, de acordo com análise de variâncias (homo ou heterocedasticidade, respectivamente) e com *bootstrap*. Análises das covariáveis foram realizadas para ajustes das variáveis-desfecho com pós-teste de *Sidak*. Os dados não paramétricos foram representados por mediana de quartis inferior e superior e comparados entre si pelo teste de *Mann-Whitney* para duas amostras e quando comparado mais de duas amostras foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*. Quando a normalização foi necessária, as variáveis foram log-transformadas. As frequências foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado. Os pontos de corte das variáveis contínuas foram calculados pelo método de *Youden*. As associações entre as variáveis foram analisadas pelas correlações de *Pearson* e de *Spearman*, de acordo com a distribuição de dados paramétricos ou não paramétricos, respectivamente.

Foi considerado para todo o estudo risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie. Os softwares IBM® *SPSS Statistics* (versão 27.0), *GraphPad Prisma* (versão 5.04) for *Windows* e Microsoft® *Excel for Mac* (versão 16.52) foram utilizados para tabulação e análise dos dados.

## 9. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS

Entre abril de 2019 e março de 2021, foram recrutadas 157 mulheres para o grupo controle e 201 para o grupo câncer de mama, totalizando 358 voluntárias. Após a exclusão daquelas que não atendiam os critérios de elegibilidade, permaneceram 150 controles e 186 mulheres com câncer de mama. O grupo câncer de mama apresentou mediana de idade superior em relação ao controle (55 vs. 51 anos;  $p < 0,001$ ), bem como uma maior frequência de mulheres na pós-menopausa (64,5% vs. 49,3%), com dislipidemias (23,5% vs. 12%) e hipertensão arterial (35,5% vs. 24%). Apresentaram sobrepeso e/ou obesidade, caracterizados por  $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ , 72% das voluntárias do grupo controle *versus* 64,3% no grupo câncer de mama. Apesar destas diferenças, o IMC foi semelhante entre os grupos nas diversas faixas etárias analisadas.

O uso de estatinas foi informado por 11% das mulheres do grupo câncer de mama e 6% no controle, sendo a sinvastatina a mais utilizada em ambos os grupos (74%). As estatinas utilizadas pelas voluntárias do grupo câncer de mama foram sinvastatina (72%), rosuvastatina (13%) e atorvastatina (4,5%) e no grupo controle, sinvastatina (77,8%) e atorvastatina (22,2%).

O grupo câncer de mama apresentou maior frequência de mulheres que declararam ser hipertensas em relação ao grupo controle (35,5% vs. 24%). Destas, somente 49% usavam drogas anti-hipertensivas, sendo a losartana a medicação mais frequente (60%). A maioria das mulheres do grupo câncer de mama usava duas ou mais medicações para o controle da hipertensão (60,6%), quando comparadas aos controles (53,8%). Outras medicações anti-hipertensivas informadas pelo grupo câncer de mama foram os diuréticos (48%), beta bloqueadores (33%) e inibidores da enzima de conversão do angiotensinogênio (21%). A losartana (77%) e os diuréticos (30%) foram as medicações mais utilizadas no grupo controle. As principais características de cada grupo estão apresentadas na tabela 1.

Entre os tumores, foi observada maior frequência do tipo histológico ductal (88,7%), seguido lobular (7%), mucinoso (3,8%) e metaplásico (0,5%). A distribuição de frequências dos tipos moleculares de câncer de mama seguiu o descrito na literatura, com predominância das neoplasias luminais (67,3%) em detrimento dos tipos HER2 (16,9%) e TN (15,8%). Em

1,6% dos casos não foi possível obter a classificação imuno- histoquímica das neoplasias. Em relação ao estágio clínico da doença, a maioria das mulheres foi categorizada com doença inicial (69%), incluindo os estágios I e II da doença. A doença avançada (estágios III e IV) foi responsável por 31% da amostra (tabela 2). Cinquenta e quatro por cento das mulheres incluídas no grupo câncer de mama declararam antecedentes familiares de neoplasias.

**Tabela 1 – Idade, dados antropométricos e clínicos**

	CONTROLE		CÂNCER DE MAMA		P
<b>n</b>	150		186		
<b>Idade (anos)*</b>	51 (38 – 59)		55 (48 – 63)		<0,001
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)*</b>	28 (25 – 31)		27 (24 – 31)		0,519
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
<b>IMC ≥ 25 kg/m<sup>2</sup></b>	108	72	119	64,3	
<b>Estado menopáusico</b>					
<b>Pré-menopausa</b>	75	50,7	66	35,5	
<b>Pós-menopausa</b>	73	49,3	120	64,5	
<b>Dislipidemia</b>	18	12	43	23,5	
<b>Uso de estatinas</b>	9	6	21	11,3	
<b>Hipertensão</b>	36	24	66	35,5	

\*Valores em mediana e intervalos interquartílicos 25%-75%. IMC = índice de massa corporal.

**Tabela 2 – Características do grupo câncer de mama**

	n	%	% agrupado*
--	---	---	----------------

<b>Tipo histológico</b>	Ductal	165	88,7	
	Lobular	13	7	
	Mucinoso	7	3,8	
	Metaplásico	1	0,5	
<b>Tipo molecular</b>	Luminal A	53	29	67,3
	Luminal B	70	38,3	
	HER2	31	16,9	32,7
	TN	29	15,8	
	Sem classificação	3	1,6	
<b>Estágio clínico</b>	I	60	32,6	69
	II	67	36,4	
	III	38	20,7	31
	IV	19	10,3	

\* Luminais (luminal A + luminal B); doença inicial (estágio I + estágio II); doença avançada (estágio III + estágio IV); TN = triplo negativo.

Na comparação entre tipos histológicos e estágios clínicos, observou-se maior frequência de mulheres nos estágios agrupados III e IV (57,1%) no grupo TN, em consonância com a maior agressividade deste tipo molecular. Em contrapartida, 86,5% das mulheres diagnosticadas com tumores luminais A encontravam-se nos estágios I e II da doença e apresentaram maior frequência de doença diagnosticada na pós-menopausa (75%). Todos os tipos moleculares foram mais frequentes no grupo de mulheres na pós-menopausa, conforme tabela 3 e apêndice A. A análise do grupo câncer de mama em relação ao estágio da doença agrupado e ao estado menopáusico não apresentou diferença nas frequências de pacientes (doença nos estágios I, II = 63,1% de mulheres na pós-menopausa; doença nos estágios III, IV = 67,7% de mulheres na pós-menopausa;  $\chi^2=0,385$ ;  $P=0,535$ ) (apêndice B).

**Tabela 3 – Tipos moleculares de câncer de mama por estado menopáusico\***

	Pré-menopausa		Pós-menopausa		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>LA</b>	13	25	39	75	52	100
<b>LB</b>	31	44,3	39	55,7	70	100
<b>HER2</b>	10	32,3	21	67,7	31	100
<b>TN</b>	10	35,7	18	64,3	28	100

\* número de casos válidos para análise das variáveis tipo molecular *versus* estado menopáusico. LA=luminal A; LB=luminal B; TN=triplo negativo.

## 5.2. PERFIL LIPÍDICO

O perfil de lípidos plasmáticos está apresentado na tabela 4 e as variáveis analisadas foram corrigidas pela idade. Não se observaram diferenças na concentração plasmática de CT, TG, apoB, colesterol nas frações de lipoproteínas e nos índices indicativos do tamanho da partícula de LDL (CT/apoB e TG/HDLc).

**Tabela 4 – Perfil de lípidos plasmáticos em mulheres controles e com câncer de mama**

	CONTROLE	CÂNCER DE MAMA	P
n *	147	166	
CT (mg/dL)	173 (153 - 202)	186 (158 - 209)	0,175
TG (mg/dL)	85 (59 - 119)	92 (68 - 116)	0,311
apoB (mg/dL)	110 (90 - 137)	107 (84 - 139)	0,462
HDLc (mg/dL)	43 (35 - 51)	42 (34 - 51)	0,648
VLDLc (mg/dL)	17 (12 - 185)	18 (14 - 23)	0,311
LDLc (mg/dL)	113 (95 - 131)	116 (127 - 189)	0,434
não-HDLc (mg/dL)	129 (110 - 157)	136 (113 - 164)	0,278
CT/apoB	1,5 (1,3 - 1,9)	1,7 (1,4 - 2,0)	0,182
TG/HDLc	1,9 (1,3 - 3,0)	2,2 (1,4 - 3,2)	0,307

Os lípidos plasmáticos foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, e a apoB, por imunoturbidimetria. O HDLc foi determinado após precipitação das lipoproteínas que contêm apoB; VLDLc foi calculado como TG/5, e não HDLc, como CT-HDLc. \* número de casos válidos para análise das variáveis. CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Valores ajustados pela idade.

Entre os 4 tipos moleculares de câncer, a idade e o IMC foram semelhantes. Neles, foram observadas diferenças na concentração plasmática de CT, a qual foi mais elevada no grupo TN [198 (173 - 214)] em relação aos grupos LB [173 (155-205);  $P=0,03$ ] e HER2 [173 (151-193);  $P=0,002$ ]. A concentração plasmática de CT também foi maior no grupo LA [193 (162-228)] em relação aos grupos LB ( $P=0,003$ ) e HER2 ( $P=0,003$ ). Não houve diferenças entre os grupos LA *versus* TN, nem LB *versus* HER2 (figura 4, painel A; apêndice C).

Maiores concentrações de TG foram observadas no grupo TN [102 (91-134)] em comparação com os grupos LB [84 (67-110);  $P=0,013$ ] e HER2 [82 (63-105);  $P=0,015$ ] (figura 4, painel B; apêndice C). Em concordância, os valores de VLDLc foram superiores no grupo TN [20 (18-27)] quando comparados aos grupos LB [17 (13-22);  $P=0,013$ ] e HER2 [16 (13-21);  $P=0,015$ ] (figura 4, painel D; apêndice C).



A concentração de apoB foi mais elevada no grupo TN [134 (102 - 158)] em comparação ao LB [98 (81 - 123);  $P=0,004$ ] e ao HER2 [100 (81-127);  $P=0,018$ ]. Maior concentração plasmática de apoB também foi observada no tipo LA [129 (90 - 151)] em relação ao LB [98 (81 - 123);  $P=0,011$ ]. Não houve diferença nos valores da apoB em relação aos demais tipos moleculares (figura 4, painel C; apêndice C).

Também foram observados valores mais elevados de não-HDLc nos tumores TN [155 (130 - 174)] em relação aos LB [129 (104 - 162);  $P=0,012$ ] e HER2 [135 (105 151);  $P=0,022$ ]. O grupo LA apresentou maiores concentrações de não-HDLc [147(121 184)] quando comparado ao LB [ $P=0,020$ ] e HER2 [ $P=0,043$ ] (figura 4, painel E; apêndice C).

Na comparação com os tipos luminais A e B agrupados, idade e IMC foram semelhantes. Foi evidenciada maior concentração plasmática de TG no grupo TN [102 (91 - 134)] em comparação ao HER2 [79 (63 - 102);  $P=0,013$ ] e aos luminais [86 (66 117);  $P=0,038$ ](tabela 5). De maneira esperada, também foi observada maior concentração de VLDLc no grupo TN [20 (18 - 27)] em comparação ao HER2 [16 (13 - 20);  $P=0,013$ ] e aos luminais [17 (13 - 23);  $P=0,038$ ].

**Tabela 5 –Perfil de lípides plasmáticos nos tipos moleculares agrupados de câncer de mama**

	Luminais	HER2	TN	P
n *	112	27	26	
Idade (anos)	55 (49 - 64)	55 (47 - 61)	56 (41 - 61)	0,416
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (24 - 31)	27 (24 - 31)	28 (24 - 31)	0,685
CT (mg/dL)	179 (157 - 210)	173 (151 - 191)	198 (173 - 214)	0,081
TG (mg/dL)	<b>86 (66 - 117)</b>	<b>79 (63 - 102)</b>	<b>102 (91 - 134)</b>	<b>0,037</b> TN vs. HER2= 0,013 TN vs. Lum=0,038
apoB (mg/dL)	<b>103 (82- 137)</b>	<b>100 (82 - 132)</b>	<b>134 (102 - 158)</b>	<b>0,046</b> TN vs. HER2= 0,025 TN vs. Lum=0,024
HDLc (mg/dL)	42 (34 - 53)	42 (32 - 51)	42 (36 - 50)	0,960
VLDLc (mg/dL)	<b>17 (13 - 23)</b>	<b>16 (13 - 20)</b>	<b>20 (18 - 27)</b>	<b>0,037</b> TN vs. HER2= 0,013 TN vs. Lum=0,038
LDLc (mg/dL)	114 (96 - 144)	116 (85 - 134)	127 (98 - 148)	0,366
não-HDL (mg/dL)	134 (110 - 164)	133 (106 - 148)	155 (130 - 174)	0,058

CT/apoB	1,8 (1,4 - 2,1)	1,8 (1,4 - 2,0)	1,5 (1,3 - 2,0)	0,207
TG/HDLc	2,0 (1,34 - 3,2)	1,7 (1,4 - 3,2)	2,5 (2,0 - 3,4)	0,221

Os lípides plasmáticos foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, e a apoB, por imunoturbidimetria. O HDLc foi determinado após precipitação das lipoproteínas que contêm apoB; VLDLc foi calculado como TG/5, e não HDLc, como CT-HDLc, sendo comparados entre os tipos moleculares de câncer de mama. \* número de casos válidos para análise das variáveis. TN=triplo negativo; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc =colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskall-Wallis* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

O grupo TN apresentou valores de apoB superiores [134 (102 - 158)] em relação aos luminais [103 (82-137)];  $P=0,024$  e HER2 [100 (82 - 132)];  $P=0,025$ ].

**Tabela 6 – Perfil de lípides plasmáticos no TN em comparação aos demais tipos moleculares de câncer de mama**

	TN	LA, LB, HER2	<i>P</i>
n *	26	139	
Idade	56 (41-61)	55 (48-63)	0,296
IMC	28 (24-31)	27 (24-31)	0,914
CT (mg/dL)	198 (173-214)	178 (156-208)	0,67
TG (mg/dL)	<b>102 (91-134)</b>	<b>85 (66-115)</b>	<b>0,020</b>
apoB (mg/dL)	<b>134 (102-158)</b>	<b>103 (82-137)</b>	<b>0,016</b>
HDLc (mg/dL)	42 (36-50)	42 (33-52)	0,795
VLDLc (mg/dL)	<b>20 (18-27)</b>	<b>17 (13-23)</b>	<b>0,020</b>
LDLc (mg/dL)	127 (98-148)	115 (95-142)	0,261
não-HDLc (mg/dL)	<b>155 (130-174)</b>	<b>133 (109-163)</b>	<b>0,034</b>
CT/apoB	1,5 (1,3-2,0)	1,8 (1,4-2,0)	0,100
TG/HDLc	2,5 (2,0-3,4)	1,9 (1,3-3,2)	0,096

Os lípides plasmáticos foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, e a apoB, por imunoturbidimetria. O HDLc foi determinado após precipitação das lipoproteínas que contêm apoB; VLDLc foi calculado como TG/5, e não HDLc, como CT-HDLc, sendo comparados entre os tipos moleculares de câncer de mama. \* número de casos válidos para análise das variáveis. TN= triplo negativo; LA = luminal A; LB = luminal

B; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

O TN também apresentou concentrações mais elevadas de TG ( $P=0,020$ ), VLDLc ( $P=0,020$ ) e apoB ( $P=0,016$ ) quando isoladamente comparado aos demais tipos de câncer de mama. Os valores de não-HDLc também foram superiores no grupo TN ( $P=0,034$ ), conforme demonstrado na tabela 6.

O perfil lipídico plasmático foi semelhante na comparação entre os 4 estágios da doença isoladamente (tabela 7) e entre os estágios agrupados I, II e III, IV (tabela 8).

**Tabela 7 – Perfil de lípidos plasmáticos de acordo com os estágios do câncer de mama**

	I	II	III	IV	P
<b>n *</b>	57	60	31	16	
<b>Idade (anos)</b>	60 (49-64)	53 (46-61)	56 (51-61)	55 (47-63)	0,250
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27 (24-31)	28 (25-31)	28 (26-31)	25 (23-30)	0,465
<b>CT (mg/dL)</b>	187 (162-218)	179 (156-201)	189 (167-208)	183 (154-241)	0,591
<b>TG (mg/dL)</b>	94 (64-117)	90 (72-118)	92 (73-115)	84 (60-111)	0,843
<b>apoB (mg/dL)</b>	105 (81-138)	106 (87-134)	109 (84-141)	105 (84-150)	0,970
<b>HDLc (mg/dL)</b>	42 (33-51)	42 (34-52)	46 (39-55)	41 (33-45)	0,422
<b>VLDLc (mg/dL)</b>	19 (13-23)	18 (14-24)	18 (15-23)	17 (12-22)	0,843

<b>LDLc (mg/dL)</b>	121 (98-146)	107 (92-136)	118 (97-139)	117 (98-172)	0,385
<b>não-HDLc (mg/dL)</b>	140 (118-169)	132 (105-158)	139 (116-163)	132 (108-196)	0,513
<b>CT/apoB</b>	1,8 (1,4-2,1)	1,7 (1,4-2,0)	1,7 (1,4-2,0)	1,6 (1,2-2,0)	0,722
<b>TG/HDLc</b>	1,9 (1,5-3,2)	2,2 (1,3-3,3)	2,1 (1,0-3,3)	2,4 (1,6-2,7)	0,976

Os lípides plasmáticos foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, e a apoB, por imunoturbidimetria. O HDLc foi determinado após precipitação das lipoproteínas que contêm apoB; VLDLc foi calculado como TG/5, e não HDLc, como CT-HDLc, sendo comparados entre os estágios I, II, III e IV de câncer de mama. \*número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

**Tabela 8 - Perfil de lípides plasmáticos de acordo com o estágio agrupado da doença**

	<b>I e II</b>	<b>III e IV</b>	<b>P</b>
<b>n *</b>	112	52	
<b>Idade (anos)</b>	56 (48-63)	55 (48-62)	0,893
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27 (24-31)	27 (24-31)	0,464
<b>CT (mg/dL)</b>	182 (157-208)	188 (163-209)	0,460
<b>TG (mg/dL)</b>	91 (67-117)	94 (70-114)	0,948
<b>apoB (mg/dL)</b>	105 (82-137)	109 (85-180)	0,416
<b>HDLc (mg/dL)</b>	42 (33-51)	44 (36-53)	0,273
<b>VLDLc (mg/dL)</b>	18 (13-23)	19 (14-23)	0,948
<b>LDLc (mg/dL)</b>	116 (95-143)	116 (96-144)	0,675
<b>não-HDL (mg/dL)</b>	135 (111-163)	137 (113-164)	0,850
<b>CT/apoB</b>	1,8 (1,4-2,0)	1,7 (1,4-2,0)	0,386
<b>TG/HDLc</b>	2,1 (1,4-3,2)	2,3 (1,2-3,2)	0,732

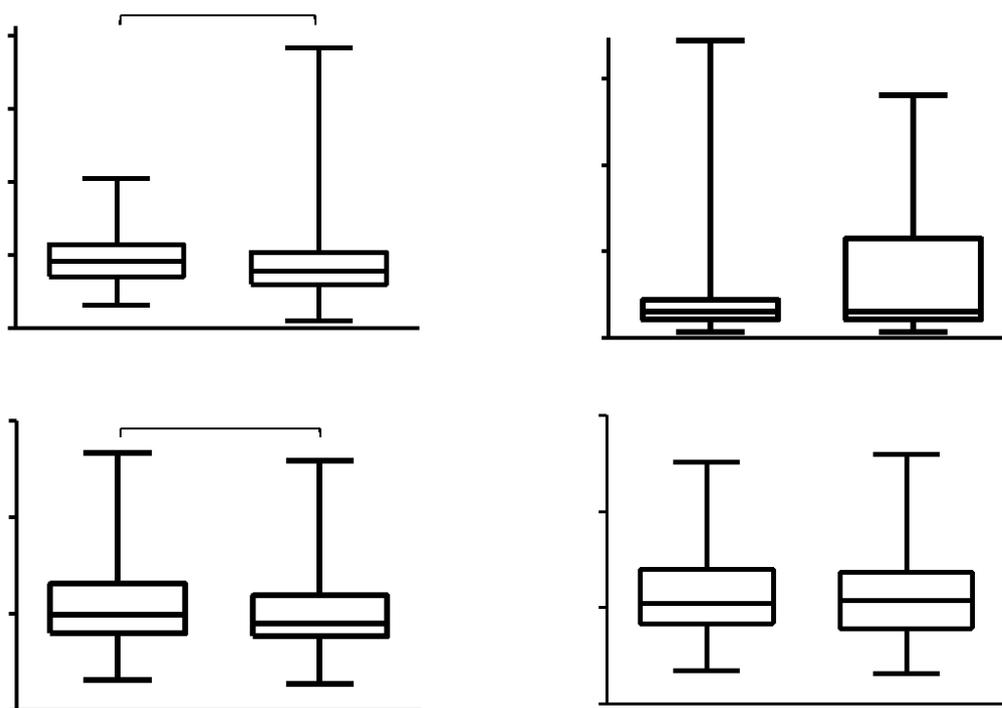
Os lípides plasmáticos foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos, e a apoB, por imunoturbidimetria. O HDLc foi determinado após precipitação das lipoproteínas que contêm apoB; VLDLc foi calculado como TG/5, e não HDLc, como CT-HDLc, sendo comparados entre os estágios I, II, III e IV de câncer de mama. \*número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de *Mann-Whitney* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

### 5.3. COMPOSIÇÃO DA HDL

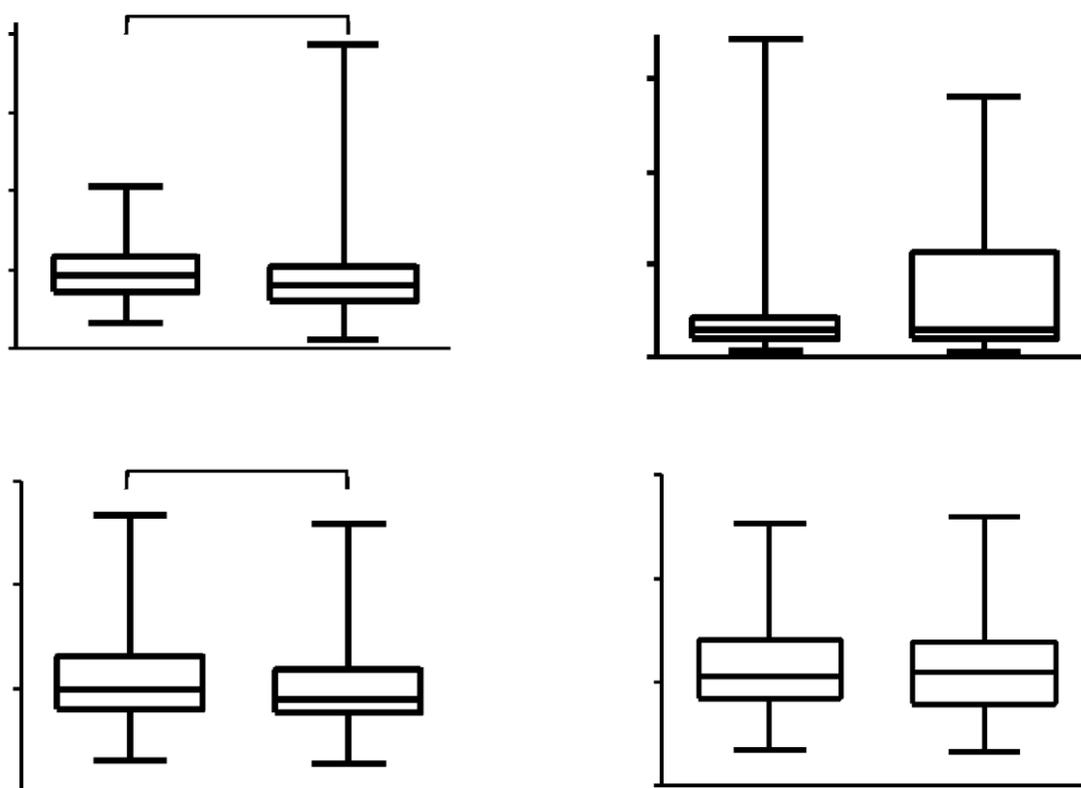
A composição da partícula isolada de HDL foi determinada quanto à concentração de CT, TG, FL, apoA-I e OC. Os conteúdos de CT (HDL-CT) e FL (HDL-FL) na HDL foram menores no grupo câncer de mama [HDL-CT 39 (30-52); HDL-FL 90 (76-119)] em comparação ao controle [HDL-CT 46 (35 - 57),  $P < 0,001$ ; HDL-FL 99 (80 - 131);  $P = 0,032$ ], conforme demonstrado na figura 51 (painéis A e C) e apêndice E. As concentrações de TG (HDL-TG) e apo A-I na HDL (HDL-apoA-I) foram semelhantes ente os grupos (figura 51, painéis B e D).

**Figura 51 – Composição da HDL em lípidos e apo A-I nos grupos câncer de mama e controle.**

119



119



A HDL foi isolada por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade; lípides e apoA-I foram determinados, respectivamente, por métodos colorimétricos enzimáticos e imunoturbidimetria. CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípidos; apo A-I = apolipoproteína A-I. Controle, n= 148; câncer de mama, n=181). Comparações feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Os valores de *P* foram corrigidos pela idade.

Um subgrupo de mulheres do grupo controle (n=82) e do grupo câncer de mama (n=82) foi analisado quanto ao conteúdo de 24HC, 25HC e 27HC na HDL (tabela 9) A mediana de idade foi maior no subgrupo com câncer de mama ( $P<0,001$ ), mas o IMC foi semelhante ao grupo controle ( $P=0,519$ ). Observou-se maior conteúdo de 27HC no grupo controle [13 (7-19)] em relação ao grupo câncer de mama [8 (5-21);  $P= 0,002$ ], mesmo após o ajuste pela idade (figura 6, painel A). Também foram realizadas correções da concentração do 27HC pelo CT plasmático (figura 6, painel B) e pelo conteúdo de colesterol da HDL (HDL-CT; figura 6, painel C), com resultados semelhantes ( $P=0,022$ ;  $P=0,028$ ).

Não houve diferença entre os grupos quanto às concentrações de 24HC e de 25HC, mesmo após as correções por CT e HDL-CT (tabela 9).

**Tabela 9 – Concentração de OC na HDL nos grupos controle e câncer de mama**

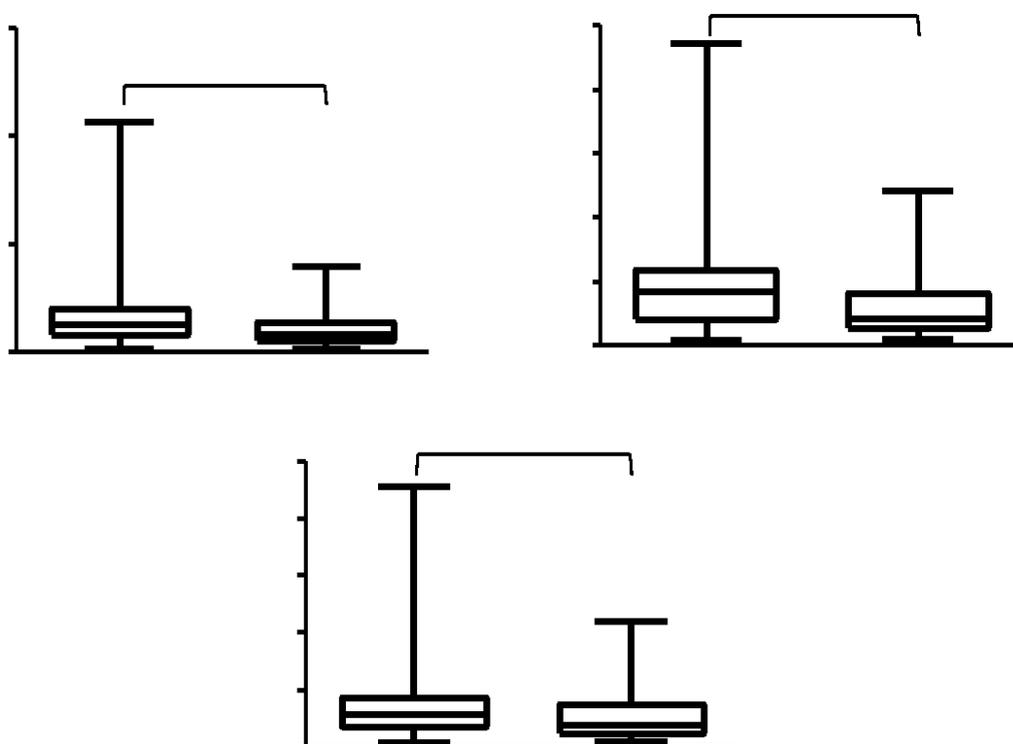
	CONTROLE		CANCER		P
	n		n		
<b>Idade (anos)</b>	<b>81</b>	<b>47 (36-58)</b>	<b>80</b>	<b>55 (47-63)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	81	27 (24-30)	66	27 (24-30)	0,519
<b>24HC (ng/mL)</b>	82	38,89 (25,93-99,07)	82	34,92 (24,12-65,45)	0,203
<b>25HC (ng/mL)</b>	82	8,07 (5,15-10,75)	82	6,87 (5,41-9,26)	0,111
<b>27HC (ng/mL)</b>	<b>81</b>	<b>12,57</b> <b>(7,39-19,41)</b>	<b>80</b>	<b>7,69</b> <b>(4,58-13,15)</b>	<b>0,002</b>
<b>24HC/CT (ng/mg)</b>	82	23,46 (16,24-46,49)	70	19,95 (12,91-42,19)	0,107
<b>25HC/CT (ng/mg)</b>	82	4,80 (3,01-6,80)	70	4,09 (3,09-5,11)	0,082
<b>27HC/CT (ng/mg)</b>	<b>81</b>	<b>8,39</b> <b>(4,01-11,74)</b>	<b>69</b>	<b>4,25</b> <b>(2,69-8,26)</b>	<b>0,022</b>
<b>24HC/HDL-CT (ng/mg)</b>	82	89,97 (66,58-223,37)	82	89,02 (70,12-164,23)	0,664
<b>25HC/HDL-CT (ng/mg)</b>	82	18,77 (11,88-23,88)	82	18,23 (13,99-24,29)	0,916
<b>27HC/HDL-CT (ng/mg)</b>	<b>81</b>	<b>28,91</b> <b>(17,31-42,65)</b>	<b>80</b>	<b>18,58</b> <b>(10,86-36,33)</b>	<b>0,028</b>

Os OC foram quantificados na HDL por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Os valores de *P* foram ajustados pela idade. IMC = índice de massa corporal;

24HC=24-hidroxicolesterol; 25HC=25-hidroxicolesterol; 27HC=27-hidroxicolesterol. 24HC/CT = 24HC corrigido pelo CT; 25HC/CT = 25HC corrigido pelo CT; 27HC/CT = 27HC corrigido pelo CT; 24HC/HDL-CT= 24HC corrigido pela HDL-CT; 25HC/HDL-CT= 25HC corrigido pela HDL-CT; 27HC/HDL-CT= 27HC corrigido pela HDL-CT.

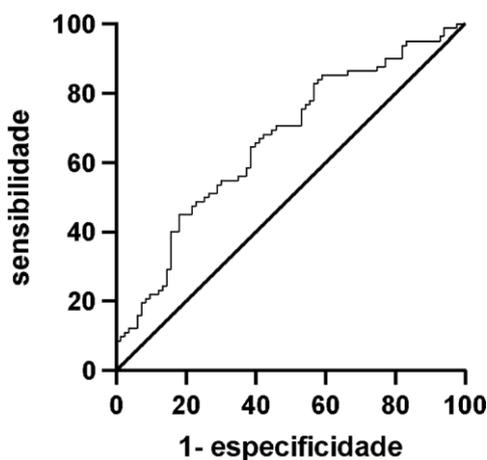
Como análise exploratória dos dados, foi construída uma curva ROC para a variável 27HC e calculado um ponto de corte para o valor de 27HC capaz de discriminar entre os grupos controle e câncer de mama (ponto de corte=11,403 ng/mL; AUC=0,659;  $X^2 = 11,854$ ;  $P < 0,001$ ), conforme demonstrado na figura 7.

**Figura 61 – Concentração de 27HC na HDL dos grupos controle e câncer de mama**



A HDL foi isolada por ultracentrifugação; os OC foram quantificados na HDL por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. 24HC=24-hidroxicolesterol; 25HC=25-hidroxicolesterol; 27HC=27-hidroxicolesterol. 24HC/CT = 24HC corrigido pelo CT; 25HC/CT = 25HC corrigido pelo CT; 27HC/CT = 27HC corrigido pelo CT; 24HC/HDL-CT= 24HC corrigido pelo HDL-CT; 25HC/HDL-CT= 25HC corrigido pela HDL-CT; 27HC/HDL-CT= 27HC corrigido pela HDL-CT. Controle, n=81; câncer de mama=80. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Os valores de  $P$  foram corrigidos pela idade.

**Figura 7 – Curva ROC do 27HC nos grupos controle versus câncer de mama.**



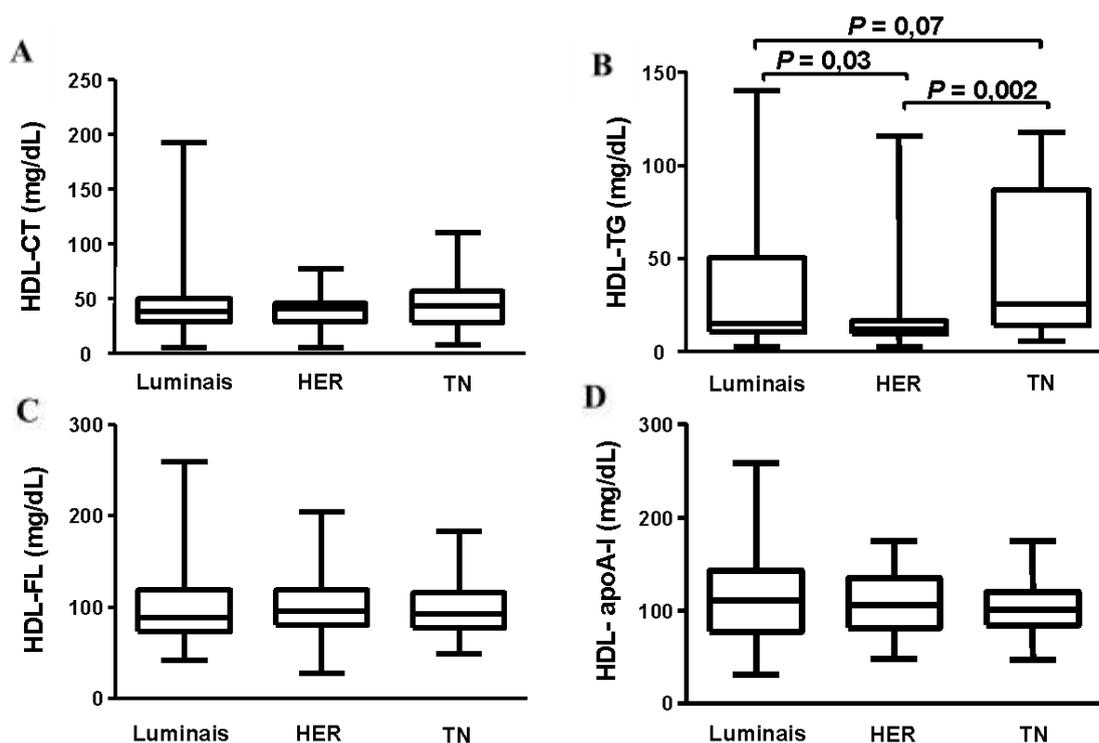
O ponto de corte foi calculado em 11,403 pelo método de *Youden* a fim de discriminar entre controles e mulheres com câncer de mama; AUC (área embaixo da curva) = 0,659;  $X^2=11,854$ ;  $P<0,001$ .

Ao se analisar a composição da HDL do grupo câncer de mama em relação aos quatro tipos moleculares, foi observado maior conteúdo de TG (HDL-TG) nos tumores TN [26 (14 – 87)] em relação aos tumores HER2 [13 (10–17);  $P=0,002$ ]<sup>2</sup>. O HDL-TG também foi mais elevado no grupo TN quando comparado aos LA [15 (12-38);  $P=0,040$ ], assim como no grupo LB [16 (11-59)] em relação aos HER2 ( $P=0,046$ ) (apêndice G). Não houve diferença de idade e IMC entre os grupos, nem diferenças nas concentrações dos OC.

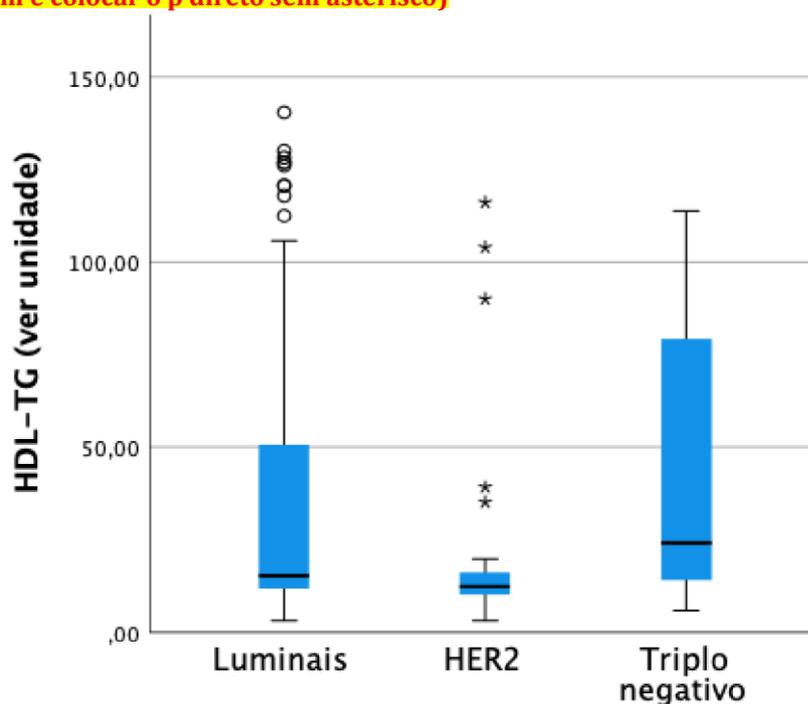
Agrupando-se os tumores luminais e os comparando aos HER2 e TN, verificou-se conteúdo mais elevado de HDL-TG nos grupos luminais [16 (11 – 52)], quando comparado ao HER2 [13 (10–17);  $P=0,030$ ]<sup>2</sup>, não tendo sido observadas diferenças entre os grupos luminais e TN ( $P=0,07$ ). Os tumores TN apresentaram valores mais elevados de HDL-TG em comparação aos HER2 ( $P=0,002$ ), como demonstrado na figura

8. Mesmo quando analisado isoladamente em relação aos demais tipos moleculares, o HDL-TG dos tumores TN apresentou valores maiores [26 (14 – 87)] do que os demais [15 (11 – 45);  $P=0,022$ ] (apêndice G). Não houve diferença na composição da HDL entre os estágios da doença conforme demonstrado na figura 9 e no apêndice H.

**Figura 82 – Composição da HDL em lípides e apoA-I, de acordo com o tipo molecular de câncer de mama.**



Colocar TN na figura, colocar asterisco no TN ; melhora estes gráficos, tira as linha da horizontal, corta a casa decimal do eixo y. unidade mg/dL. . (colocar traço entre os grupos que diferem e colocar o p direto sem asterisco)

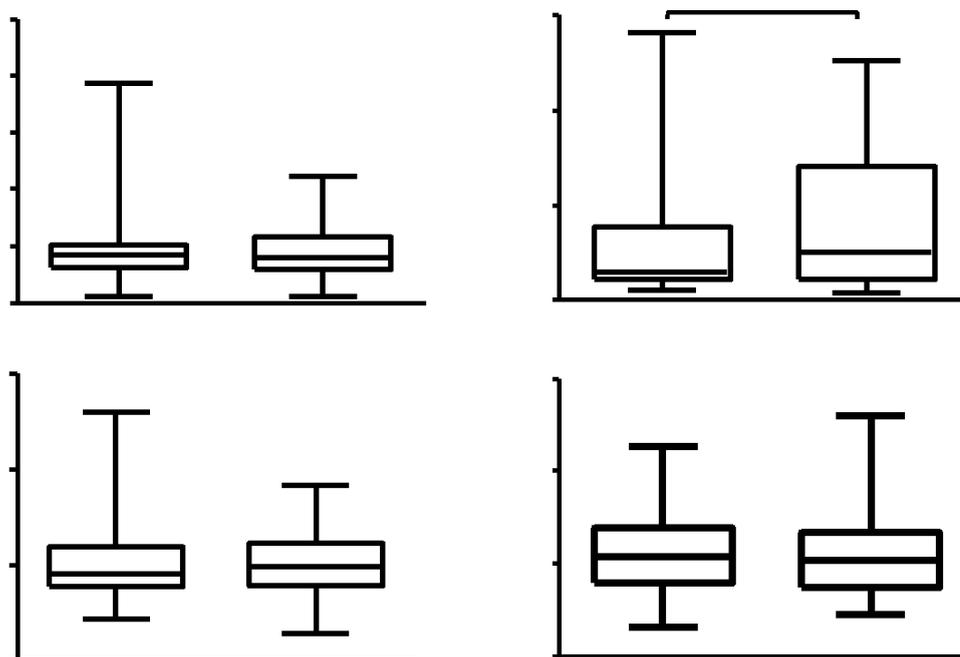


A HDL foi isolada do plasma por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade e a concentração lípidos e apoA-I determinadas por método enzimático colorimétrico e imunoturbidimetria, respectivamente. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 0,05 (luminais, n= 120; HER2, n=31; TN, n=29). HDL-CT: colesterol total na HDL; HDL-TG: triglicérides na HDL; HDL-FLfosfolípidos na HDL; HDL-apoA-I: apolipoproteína A-I na HDL; TN = triplo negativo.

Colocar os outros lípidos da HDL e apo A-I na figura também (painéis como na fig 1). Manda estes números pra Monique colocar no prisma e fazer o gráf

## MANDEI PARA MO

Figura 9 – Composição da HDL em lípides e apoA-I de acordo com os estágios da doença.



A HDL foi isolada por ultracentrifugação em gradiente de densidade; lípides e apoA-I foram determinados, respectivamente, por métodos colorimétricos enzimáticos e imunoturbidimetria nas HDL isoladas de mulheres com câncer de mama, de acordo com os estágios agrupados da doença (estágios I e II; n=117 e estágios III e IV, n=62). CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípidos; apoA-I = apolipoproteína A-I. Comparações feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%);

### 9.3.4. FUNCIONALIDADE DA HDL

O efluxo de  $^{14}\text{C}$ -colesterol mediado pela HDL foi avaliado em um subgrupo de participantes. Neste, a composição da HDL diferiu, tendo o grupo controle apresentado maiores concentrações de HDL-CT, HDL-TG e HDL-FL, após os ajustes pela idade (tabela

10) O efluxo de  $^{14}\text{C}$ -colesterol foi semelhante entre os grupos controle e câncer de mama (tabela 10) e entre os tipos moleculares (dados não mostrados).

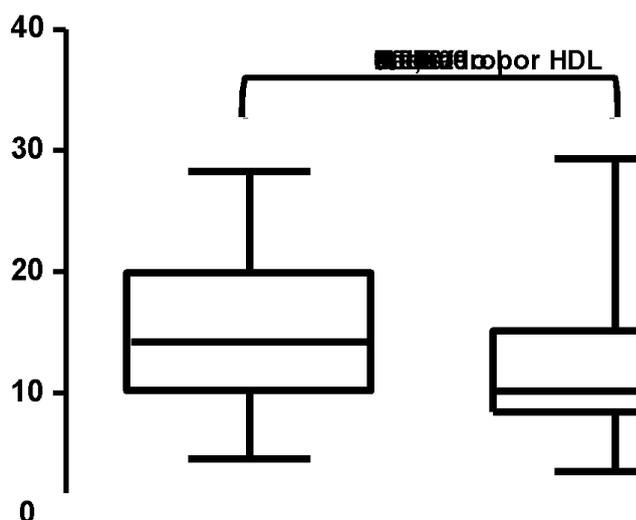
**Tabela 10 – Efluxo de <sup>14</sup>C-colesterol mediado pela HDL, perfil lipídico e composição da HDL em mulheres com câncer de mama e controles**

	CONTROLE	CÂNCER	P
n*	132	126	
Efluxo (%)	12 (9-18)	13 (9-19)	0,501
Idade (anos)	<b>48 (37-58)</b>	<b>55 (49-63)</b>	<b>&lt;0,001</b>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28 (25-31)	27 (24-31)	0,391
CT (mg/dL)	172 (151-199)	178 (155-206)	0,423
TG (mg/dL)	84 (59-122)	92 (68-116)	0,224
apoB (mg/dL)	111 (89-139)	107 (82-141)	0,428
HDLc (mg/dL)	41 (35-51)	40 (32-48)	0,109
VLDLc (mg/dL)	17 (12-24)	18 (14-23)	0,224
LDLc (mg/dL)	111 (95-131)	114 (95-142)	0,522
não-HDLc (mg/dL)	127 (109-156)	136 (113-163)	0,252
CT/apoB (mg/dL)	1,5 (1,3-1,9)	1,7 (1,4-2,0)	0,065
TG/HDL (mg/dL)	1,9 (1,3-3,1)	2,3 (1,5-3,5)	0,091
HDL-CT (mg/dL)	<b>44 (34-55)</b>	<b>37 (30-46)</b>	<b>0,001</b>
HDL-TG (mg/dL)	<b>14 (10-19)</b>	<b>13 (10-16)</b>	<b>0,011</b>
HDL-FL (mg/dL)	<b>98 (80-131)</b>	<b>87 (73-116)</b>	<b>0,001</b>
HDL-apoA-I (mg/dL)	104 (82-141)	112 (82-142)	0,700

\* número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa; FL = fosfolípidos; apo A-I = apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Os valores de P foram ajustados pela idade.

Na comparação entre os estágios agrupados, verificou-se redução do efluxo de colesterol no grupo nos estágios III, IV [10 (8 – 15)] em comparação com a doença nos estágios I, II [14 (10 – 20);  $P=0,01$ ], como demonstrado na figura 10. Idade, IMC, perfil lipídico e composição da HDL foram semelhantes nestes indivíduos. A concentração de 27HC (ng/mL) foi de 9 (5-15) e 5 (4-9), respectivamente nas mulheres com doença nos estágios I, II e III, IV ( $P=0,053$ ) (tabela 11).

Figura 10 – Efluxo de  $^{14}\text{C}$ -colesterol mediado pela HDL em mulheres com câncer de mama e controles



A funcionalidade da partícula HDL foi analisada a partir da remoção de  $^{14}\text{C}$ -colesterol de macrófagos mediada pela HDL. Macrófagos sobrecarregados com LDL acetilada e  $^{14}\text{C}$ -colesterol foram incubados com HDL (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) isoladas de mulheres com câncer de mama em diferentes estágios agrupados da doença [estágios I e II (n=89) e estágios III e IV (n=36)], como aceptora de colesterol. Mulheres com doença nos estágios mais avançados apresentaram efluxo 28,6% menor do que aquelas nos estágios I, II. Comparações feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

Tabela 11 – Efluxo de  $^{14}\text{C}$ -colesterol e variáveis clínicas e lipídicas de acordo com os estágios agrupados

I e II	III e IV	P
--------	----------	---

n*	89	36	
<b>Efluxo (%)</b>	<b>14 (10-20)</b>	<b>10 (8-15)</b>	<b>0,010</b>
<b>Idade (anos)</b>	56 (49-63)	55 (47-64)	0,686
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27 (25-31)	27 (24-31)	0,684
<b>Ki67</b>	<b>20 (10-30)</b>	<b>30 (20-60)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>CT (mg/dL)</b>	181 (155-206)	178 (151-214)	0,960
<b>TG (mg/dL)</b>	90 (69-118)	96 (75-118)	0,971
<b>apoB (mg/dL)</b>	106 (83-137)	113 (80-147)	0,498
<b>HDLc (mg/dL)</b>	40 (32-48)	40 (32-49)	0,992
<b>VLDLc (mg/dL)</b>	18 (14-24)	19 (15-24)	0,971
<b>LDLc (mg/dL)</b>	113 (95-142)	116 (96-148)	0,675
<b>não-HDLc (mg/dL)</b>	136 (115-162)	137 (110-167)	0,901
<b>CT/apoB (mg/dL)</b>	1,7 (1,3-2,0)	1,6 (1,2-1,9)	0,247
<b>TG/HDL (mg/dL)</b>	2,2 (1,5-3,5)	2,5 (1,3-3,6)	0,963
<b>HDL-CT (mg/dL)</b>	38 (30-46)	36 (25-47)	0,343
<b>HDL-TG (mg/dL)</b>	13 (10-15)	13 (9-22)	0,623
<b>HDL-FL (mg/dL)</b>	87 (72-108)	88 (74-119)	0,362
<b>HDL-apoA-I (mg/dL)</b>	110 (83-143)	114 (78-142)	0,796
<b>24HC (ng/mL)</b>	30,95 (23,08-66,79)	40,04 (25,22-74,65)	0,528
<b>25HC (ng/dL)</b>	6,79 (5,27-8,53)	6,92 (5,86-10,10)	0,528
<b>27HC (ng/dL)</b>	8,84 (4,58-14,71)	4,96 (3,68-8,77)	0,053

\* número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípides; apo A-I = apolipoproteína A-I; 24HC=24-hidroxicolesterol; 25HC=25-hidroxicolesterol; 27HC=27-hidroxicolesterol. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

## 6. DISCUSSÃO

Na presente investigação, avaliou-se a concentração de lípidos plasmáticos, a composição e a funcionalidade da HDL isolada de mulheres portadoras de câncer de mama em comparação à controles, considerando-se idade e IMC. O perfil de lípidos plasmáticos foi semelhante entre os grupos câncer de mama e controle, porém foram evidenciadas alterações lipídicas na composição da HDL do grupo câncer de mama. A habilidade desta lipoproteína em remover colesterol celular foi menor nos estágios avançados da doença em comparação à doença inicial, a despeito de composição lipídica e proteica similar na partícula.

O perfil de lípidos plasmáticos é associado com o risco de desenvolvimento de câncer de mama, prognóstico da doença e resposta terapêutica<sup>16,17,18</sup>. Entretanto, não há consenso na literatura e os estudos diferem nos desenhos experimentais e quanto à presença de componentes da síndrome metabólica, estado menopáusico e faixa etária. No presente estudo, evidenciou-se em uma casuística ampla, ainda não submetida a nenhum tratamento oncológico e com estado menopáusico semelhante, que a concentração de lípidos plasmáticos, bem como os índices de tamanho da partícula de LDL (CT/apoB e TG/HDLc) não diferiram em relação às mulheres controles. Os valores foram ajustados por idade, cuja mediana foi superior no grupo câncer de mama.

Como esperado, a maioria dos tumores era do tipo luminal (67,3%), com predomínio de doença estágios I e II (69%). A frequência de doença avançada (estágios III e IV) foi maior em mulheres com tumores TN (57,1%) e menor naquelas com tumores LA (13,5%).

Comparando-se o perfil lipídico entre os diferentes tipos moleculares (luminais A e B, HER2 e TN) não se observaram diferenças de idade e IMC. Contudo, valores mais elevados de CT, TG, VLDLc e não-HDLc foram encontrados nos tumores TN. Estes tumores cursam com concentrações elevadas de TG e com aumento de mortalidade e redução de sobrevida global<sup>85</sup>. Neste aspecto, evidencia-se a ação dos TG sobre a proliferação, crescimento e metástase, considerando-se a contribuição dos ácidos graxos como fonte energética celular<sup>85</sup>. Elevação da colesterolemia é descrita como fator contribuinte ao desenvolvimento do câncer de mama, independentemente do IMC e de receptores de estrogênio<sup>50,86</sup>. Entretanto, não há na literatura uma análise detalhada do perfil de lípidos plasmáticos e componentes de síndromes metabólicas entre os diferentes tipos moleculares de câncer de mama.

A associação negativa entre a concentração plasmática de HDLc com o câncer de mama é evidenciada por vários estudos observacionais e retrospectivos<sup>53,69,87, 88</sup>

<sup>72,86,89,90,91,92</sup>

, embora persistam controvérsias. Elas residem nas variações das populações estudadas quanto ao tempo de doença, estadiamento, tipos histológicos e moleculares, bem como influências impostas pela presença de comorbidades metabólicas associadas ao risco de tumor de mama e terapias oncológicas. Além

disso, faltam evidências acerca da relação com a apoA-I, principal componente proteico da HDL, e responsável por grande parte de suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e no transporte reverso de colesterol.

A fração total de HDL compreende um grupo heterogêneo de partículas, caracterizadas por um espectro amplo de funcionalidade e de tamanho, o qual varia entre, aproximadamente, 7 a 14 nm <sup>93</sup>. A geração de HDL nos compartimentos plasmáticos e tecidual é modulada por fatores genéticos e ambientais, estes últimos envolvendo componentes da dieta e atividade física. No plasma, a formação das pré beta HDL vincula-se à metabolização de lipoproteínas ricas em TG, pela lipoproteína lipase, o que depende, entre outros fatores, do grau de sensibilidade à insulina. Este é negativamente modulado pela presença de diabetes mellitus, obesidade, inflamação e dislipidemias.

No compartimento plasmático e linfático, as pequenas HDL são metabolizadas pelas atividades da lecitina colesterol aciltransferase, proteína de transferência de colesterol esterificado e lipase hepática, com redistribuição de seus componentes, o que reflete sua atividade ao longo do transporte reverso de colesterol. No fígado e intestino, a formação de HDL é intermediada pelos transportadores ABCA-1, cuja expressão e meia-vida é regulada por componentes inflamatórios e hiperglicemia <sup>94</sup>. Sendo assim, em muitos casos, deve-se considerar na relação HDLc e câncer de mama, a ação secundária desta lipoproteína frente a outros componentes metabólicos, os quais por si, contribuem para a tumorigênese. Alterações na funcionalidade da HDL, descritas em várias condições metabólicas que favorecem o câncer, podem também contribuir para explicar os resultados contraditórios descritos na associação HDLc e câncer <sup>68</sup>.

Classicamente, as HDL são reportadas como inversamente relacionadas à doença macrovascular aterosclerótica. Entretanto, são interessantes as observações de que a elevação do HDLc em ensaios clínicos com utilização de medicamentos e estudos de randomização mendeliana, falham em evidenciar desfechos cardiovasculares favoráveis <sup>95</sup>. Além disso, em modelos animais experimentais, onde a concentração de HDLc é grandemente elevada ou reduzida, respectivamente, pelo *knockout* ou hiperexpressão do gene *Scarb1* (gene que codifica para o receptor SR-

BI), observa-se dissociação entre a concentração plasmática de HDLc e a aterogênese. Esses achados sugerem que as métricas clássicas de HDLc ou apoA-I podem não refletir, necessariamente, a funcionalidade destas partículas.

A HDL isolada de mulheres com câncer de mama apresentou menor concentração de CT, FL e 27HC, quando comparada à HDL do grupo controle. Estas alterações foram observadas mesmo após ajuste pela idade e com valores de IMC e lípides plasmáticos semelhantes entre os grupos. A remoção do excesso de colesterol de células periféricas é precedida pela exportação de FL para as apoA-I dissociadas ou pré-beta HDL, por intermédio do ABCA-1. Neste sentido, é possível considerar que a redução do conteúdo de CT e FL reflita uma inabilidade da partícula em remover colesterol celular. Ademais, o menor conteúdo desses lípides poderia estar vinculado ao menor desprendimento de componentes de superfície das lipoproteínas ricas em TG, durante lipólise mediada pela lipoproteína lipase, num processo, recentemente, referenciado como transporte reverso de colesterol remanescente <sup>96</sup>.

O 27HC é exportado das células e carregado na circulação, principalmente em associação à HDL. A saída deste óxido das células representa via alternativa ao transporte reverso, contribuindo para limitar o conteúdo de esteróis intracelulares. Em cânceres de mama, o 27HC vincula-se ao potencial de proliferação e metástase dependente de LXR, por atuar como SERM <sup>41,57</sup>. Assim, seu menor conteúdo na HDL conjuntamente com colesterol, indicam prejuízo na homeostase intracelular de esteróis, favorável à evolução tumoral. Contudo, não é possível afirmar qual ou quais mecanismos atuem sobre a composição da HDL em vista dos presentes resultados. Os ensaios *in vitro* de remoção de <sup>14</sup>C-colesterol de macrófagos não evidenciaram alteração na habilidade da HDL em atuar com aceptora de colesterol de macrófagos cultivados, quando foram comparadas mulheres com câncer de mama e controles.

Além da habilidade intrínseca da HDL em receber colesterol, é importante considerar que o efluxo de lípides é modulado por componentes celulares, como biodisponibilidade de colesterol livre ou não esterificado e conteúdo e funcionalidade

de ABCA-1, ABCG-1 e SR-BI <sup>97</sup>. Caracteristicamente, o ABCA-1 é expresso na glândula mamária e seu conteúdo é apontado como reduzido no câncer de mama e associado à positividade de linfonodos <sup>66</sup>. Sua deficiência contribui para elevação do conteúdo de colesterol celular e mitocondrial, mitigando processos de morte celular intermediados por esta organela, o que favorece a sobrevivência da célula tumoral <sup>98</sup>. Além disso, sua expressão atua negativamente sobre a eficiência terapêutica de quimioterápicos <sup>99</sup> e é referida por alguns autores, como marcadora de tumores TN <sup>100</sup>.

Tumores sólidos acumulam grandes quantidades de colesterol <sup>101,102</sup>, por intermédio do aumento de sua síntese e da captação de lipoproteínas <sup>102,103</sup>. O SR-BI medeia o efluxo de colesterol livre a favor de gradiente de concentração para a HDL. Entretanto, pode também promover a captação de lipoproteínas modificadas, favorecendo, contrariamente, o aporte de colesterol às células e a progressão tumoral <sup>104</sup>. A maior expressão de SR-BI vincula-se à maior agressividade e ao pior prognóstico tumoral <sup>50,105,106,107</sup>, enquanto mutações no *Scarb1* relacionam-se à inibição da proliferação tumoral <sup>108</sup>.

Quando avaliado de acordo com o estágio clínico agrupado da doença (I, II e III, IV) o grupo câncer de mama não apresentou alteração no conteúdo de CT, TG, FL e OC (27HC, 25HC e 24HC) na HDL. Não obstante, a capacidade desta lipoproteína em remover colesterol celular foi reduzida em 28,6% nas mulheres em estágio avançado da doença em comparação àquelas em estágio localizado. Além do mais, neste subgrupo de participantes, as concentrações de lípides séricos foram semelhantes. Sendo assim, é possível desvincular a concentração de HDLc no plasma e componentes da composição da partícula de sua função nos estágios mais avançados do câncer de mama.

A base fisiopatológica da redução da funcionalidade da HDL em estágios avançados do câncer de mama não foi alvo de investigação do presente estudo. É possível que o insulto inflamatório, oxidativo e imunogênico prevalentes na doença avançada possam favorecer a modificação da HDL no microambiente tumoral, comprometendo sua função. Em última instância, isto deve criar um círculo vicioso, agravando a evolução do tumor, pelo prejuízo na remoção de esterol necessário à replicação e metástase. Além de carrear citocinas inflamatórias que mitigam sua

funcionalidade, é importante considerar que as HDL transportam microRNAs <sup>109</sup> capazes de controlar a expressão de proteínas em diferentes tipos celulares. Os microRNAs podem ser produzidos pelas células tumorais <sup>110,111</sup> ou serem entregue a elas, por intermédio do SR-BI <sup>112</sup>. Análises em andamento avaliam o conteúdo diferencial de microRNAs nas HDL da casuística do presente estudo e adicionarão mais dados à funcionalidade desta lipoproteína (projeto FAPESP #2021/02401-9).

O conceito de modulação da HDL pelo tumor por causação reversa pode desvincular a HDL, por si, como preditora de risco tumoral. Neste sentido, a HDL seria mais aplicada como marcador de evolução do tumor do que propriamente protetora ou indutora de sua gênese.

Acúmulo de colesterol, especialmente em macrófagos, favorece o estresse oxidativo e inflamatório, os quais modulam negativamente o conteúdo de ABCA-1. Isto se dá pelo estabelecimento de estresse de retículo endoplasmático que deflagra vias intracelulares de degradação proteasomal e lisosomal do transportador ABCA-1, comprometendo ainda mais a exportação de colesterol celular <sup>113,114</sup>. A modificação química de HDL, evidenciada em várias condições metabólicas e na presença de glicação avançada, oxidação, carbamoilação ou cloração, reduz sua habilidade em mediar a remoção de lípidos celulares <sup>115,116,117,118</sup>. HDL isoladas de indivíduos com diabetes mellitus induzem crescimento e invasão tumoral em câncer de mama, o que evidencia uma ligação entre a geração de produtos de glicação avançada (AGEs) *in vivo* e a evolução tumoral <sup>119</sup>. Diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia e outros componentes da síndrome metabólica aumentam o estresse carbonila e a geração dos AGEs e atuam como contribuintes para o desenvolvimento de câncer de mama <sup>120</sup>.

Produtos de glicação avançada e seu receptor, AGER (RAGE) encontram-se aumentados em vários tumores, incluindo os de mama, e são associados ao potencial metastático e piores desfechos clínicos <sup>121,122</sup>. Uma característica atribuída às células cancerosas é a glicólise aeróbia, que proporciona alto fluxo glicolítico e geração de lactato, com a manutenção da fosforilação oxidativa em taxa constante. Esse efeito conhecido como glicólise aeróbia ou efeito Warburg <sup>123</sup>, favorece a sobrevivência celular, fornecendo substratos para a proliferação, a resistência à

hipóxia e atenuação da apoptose. Por outro lado, devido ao efeito Warburg, ocorre a formação de produtos glicolíticos altamente reativos, como metilglioxal, que rapidamente formam os AGEs, reforçando o estresse oxidativo e a inflamação <sup>124</sup>.

Como os AGEs induzem inflamação e são gerados por ela, em última análise há um círculo vicioso que desencadeia estresse de retículo endoplasmático nas células tumorais ou macrófagos infiltrados no microambiente tumoral. Conforme discutido acima, o estresse de retículo vincula-se ao prejuízo no efluxo de colesterol, por aumentar a taxa de degradação intracelular de ABCA-1. O acúmulo de colesterol favorece a geração de várias espécies tóxicas de OC, as quais contribuem para o potencial proliferativo e metastático<sup>125</sup>.

Os achados do presente estudo apontam para prejuízo da funcionalidade da HDL em tumores avançados, o que se desvincula de modificação na sua composição clássica em lípides e apo A-I. Interessante que, quando comparada com HDL de controles, a HDL do câncer de mama apresenta menor conteúdo em 27HC, o que não foi estatisticamente diferente entre os tumores avançados, talvez em decorrência do menor número de indivíduos nesta subanálise. Trata-se da primeira demonstração de prejuízo na capacidade de remoção de colesterol celular pela HDL no câncer de mama, independentemente de componentes quantitativos do perfil lipídico plasmático. Entretanto, não foram considerados componentes clínicos da síndrome metabólica devido ao fluxo de coleta instituído. A classificação histológica e molecular dos tumores foi obtida dos prontuários médicos, não sendo feita uma reavaliação das amostras. Contudo, as análises foram realizadas em um mesmo laboratório, o que garante homogeneidade nos resultados.

## **8. CONCLUSÃO**

1. A concentração de lípides plasmáticos, corrigida por idade, é semelhante entre mulheres controles e com câncer de mama, recém diagnosticadas e virgens de tratamento;
2. Tumores TN apresentam-se com maior concentração plasmática de CT, TG, apoB e não HDLc em relação aos demais tipos moleculares;
3. A HDL isolada do câncer de mama apresenta menor conteúdo em CT, FL e 27HC, mas mantém sua capacidade de remover colesterol celular, quando comparada à HDL de controles;

4. No câncer de mama, a HDL isolada de mulheres com doença nos estágios III e IV apresenta capacidade comprometida de remover colesterol celular, a despeito da composição em lípidos e apoA-I ser semelhante à de controles.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Surveillance Epidemiology and End Results (SEER). Cancer Stat Facts: Female breast cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
- (2) Instituto Nacional Do Câncer José De Alencar Gomes Da Silva (INCA). Controle do câncer de mama: conceito e magnitude. Disponível em <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>.
- (3) Hankinson SE, Eliassen AH. Circulating sex steroids and breast cancer risk in premenopausal women. *Horm Cancer*. 2010;1(1):2-10.
- (4) Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. *Annu Rev Public Health*. 1996; 17:47-67.
- (5) Tamimi RM, Spiegelman D, Smith-Warner SA, Wang M, Pazaris M, Willett WC, Eliassen AH, Hunter DJ. Population Attributable Risk of Modifiable and Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors in Postmenopausal Breast Cancer. *Am J Epidemiol*. 2016;184(12):884-93.
- (6) Kotsopoulos, J., Chen, W.Y., Gates, M.A. et al. Risk factors for ductal and lobular breast cancer: results from the nurses' health study. *Breast Cancer Res*. 2010; 12, R106.
- (7) Chlebowski RT, Anderson GL, Aragaki AK, Manson JE, Stefanick ML, Pan K, Barrington W, Kuller LH, Simon MS, Lane D, Johnson KC, Rohan TE, Gass MLS, Cauley JA, Paskett ED, Sattari M, Prentice RL. Association of menopausal hormone therapy with breast cancer incidence and mortality during long-term follow-up of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA*. 2020; 28;324(4):369-80.
- (8) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.
- (9) Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C,

Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S; Women's Health Initiative Steering Committee. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004;291(14):1701-12.

- (10) McNeil M. Menopausal Hormone Therapy: Understanding Long-term Risks and Benefits. *JAMA*. 2017; 318(10):911-13.
- (11) Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS. Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol*. 2002;160(2):597-604.
- (12) Lee K, Seifert BA, Shimelis H, Ghosh R, Crowley SB, Carter NJ, et al. Clinical validity assessment of genes frequently tested on hereditary breast and ovarian cancer susceptibility sequencing panels. *Genet Med* [Internet]. 2019;21(7):1497–506.
- (13) Lu HM, Li S, Black MH, Lee S, Hoiness R, Wu S, Mu W, Huether R, Chen J, Sridhar S, Tian Y, McFarland R, Dolinsky J, Tippin Davis B, Mexal S, Dunlop C, Elliott A. Association of Breast and Ovarian Cancers with Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncol*. 2019;5(1):51-7.
- (14) White, A.J., D'Aloisio, A.A., Nichols, H.B. et al. Breast cancer and exposure to tobacco smoke during potential windows of susceptibility. *Cancer Causes Control*. 2017 ; 28, 667–75.
- (15) Laden F, Hunter DJ. Environmental risk factors and female breast cancer. *Ann Rev Public Health* [Internet]. 1998;19(1):101–23.
- (16) McDonnell DP, Park S, Goulet MT, Jasper J, Wardell SE, Chang CY, Norris JD, Guyton JR, Nelson ER. Obesity, cholesterol metabolism, and breast cancer pathogenesis. *Cancer Res*. 2014;74(18):4976-82.
- (17) Munir MT, Ponce C, Powell CA, Tarafdar K, Yanagita T, Choudhury M, Gollahon LS, Rahman SM. The contribution of cholesterol and epigenetic changes to the pathophysiology of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018;183:1-9.
- (18) Baek AE, Yu YRA, He S, Wardell SE, Chang CY, Kwon S, et al. The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8(1):1–10.
- (19) Kwan ML, Habel LA, Flick ED, Quesenberry CP, Caan B. Post-diagnosis statin use and breast cancer recurrence in a prospective cohort study of early stage breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(3):573-9.

- (20) Islam MM, Yang HC, Nguyen PA, Poly TN, Huang CW, Kekade S, Khalfan AM, Debnath T, Li YJ, Abdul SS. Exploring association between statin use and breast cancer risk: an updated meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;296(6):1043-53.
- (21) Gobbi, Helenice. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [online].* 2012; 48(6):463-74.
- (22) Frkovic-Grazio S, Bracko M. Long term prognostic value of Nottingham histological grade and its components in early (pT1N0M0) breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 2002;55(2):88-92.
- (23) Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.
- (24) Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11(2):174-83.
- (25) Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF; International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656-64.
- (26) Bundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev [Internet].* 2001;27(3):137-42.
- (27) Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
- (28) Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490(7418):61-70.
- (29) Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(7):e48-72.

- (30) Tokunaga E, Hisamatsu Y, Tanaka K, Yamashita N, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y. Molecular mechanisms regulating the hormone sensitivity of breast cancer. *Cancer Sci.* 2014;105(11):1377-83.
- (31) Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: ASCO/CAP Guideline Update. *J Clin Oncol [Internet]*. 2020;38(12):1346–66.
- (32) Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L, Díez M, Viladot M, Arance A, Muñoz M. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015; 2: S26-35.
- (33) Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(2):241-56.
- (34) Hamilton E, Shastry M, Shiller SM, Ren R. Targeting HER2 heterogeneity in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2021;100: 102286.
- (35) Villman K, Sjöström J, Heikkilä R, Hultborn R, Malmström P, Bengtsson NO, Söderberg M, Saksela E, Blomqvist C. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol.* 2006;45(5):590-6.
- (36) Palma G, Frasci G, Chirico A, Esposito E, Siani C, Saturnino C, Arra C, Ciliberto G, Giordano A, D'Aiuto M. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. *Oncotarget.* 2015;6(29):26560-74.
- (37) Cintra, Jane Rocha Duarte et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. *Revista da Associação Médica Brasileira* [online]. 2012; 58(2):178-187.
- (38) Montagna E, Bagnardi V, Rotmensz N, Viale G, Renne G, Canello G, Balduzzi A, Scarano E, Veronesi P, Luini A, Zurrada S, Monti S, Mastropasqua MG, Bottiglieri L, Goldhirsch A, Colleoni M. Breast cancer subtypes and outcome after local and regional relapse. *Ann Oncol.* 2012;23(2):324-31.
- (39) Hortobagyi GN. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual. The American College of Surgeons (ACS), Chapter 48, Eighth edition, Breast. Chicago, 2017.

- (40) Van Poznak C, Harris LN, Somerfield MR. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women with Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Oncol Pract*. 2015;11(6):514-516.
- (41) Yamauchi Y, Rogers MA. Sterol Metabolism and Transport in Atherosclerosis and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:509.
- (42) Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even Warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2012 20;21(3):297-308.
- (43) Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109(9):1125-31.
- (44) Quintão, ECR; Nakandakare, ER ; Passarelli, M. (Eds.). *Lípidos: do metabolismo à aterosclerose*. São Paulo: Salvier, 2011.
- (45) Björkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest* [Internet]. 2002;110(6):725–30. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI16388>
- (46) Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev*. 2000;80(1):361-554.
- (47) Gesquière L, Loreau N, Blache D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(4):541-7.
- (48) Gaus K, Dean RT, Kritharides L, Jessup W. Inhibition of cholesterol efflux by 7-ketocholesterol: comparison between cells, plasma membrane vesicles, and liposomes as cholesterol donors. *Biochemistry*. 2001 30;40(43):13002-14.
- (49) Korytowski W, Wawak K, Pabisz P, Schmitt JC, Chadwick AC, Sahoo D, Girotti AW. Impairment of Macrophage Cholesterol Efflux by Cholesterol Hydroperoxide Trafficking: Implications for Atherogenesis Under Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(10):2104-13.
- (50) Danilo C, Frank PG. Cholesterol and breast cancer development. *Current Opinion in Pharmacology* 2012; 12:677–82.
- (51) Ha, M., Sung, J. & Song, YM. Serum total cholesterol and the risk of breast cancer in postmenopausal Korean women. *Cancer Causes Control*. 2009; 20, 1055-60.
- (52) Hu J, La Vecchia C, de Groh M, Negri E, Morrison H, Mery L; Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Dietary cholesterol intake and cancer. *Ann Oncol*. 2012;23(2):491-500.

- (53) Kucharska-Newton AM, Rosamond WD, Mink PJ, Alberg AJ, Shahar E, Folsom AR. HDL-cholesterol and incidence of breast cancer in the ARIC cohort study. *Annals of Epidemiol.* 2008; 18:671–7.
- (54) Kim Y, Park SK, Han W, Kim DH, Hong YC, Ha EH, Ahn SH, Noh DY, Kang D, Yoo KY: Serum high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer risk by menopausal status, body mass index, and hormonal receptor in Korea. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:508-15.
- (55) Alikhani N, Ferguson RD, Novosyadlyy R, Gallagher EJ, Scheinman EJ, Yakar S, et al. Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model. *Oncogene.* 2013;32: 961–67.
- (56) Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, Carver NJ, Pillai RV, Sullivan PM, Sondhi V, Umetani M, Geradts J, McDonnell DP. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science.* 2013 ;342(6162):1094-8.
- (57) DuSell CD, Umetani M, Shaul PW, Mangelsdorf DJ, McDonnell DP. 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator. *Mol Endocrinol.* 2008;22(1):65-77.
- (58) Kimbung S, Chang CY, Bendahl PO, Dubois L, Thompson JW, McDonnell DP, Borgquist S. Impact of 27-hydroxylase (CYP27A1) and 27-hydroxycholesterol in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2017; 24(7):339-349.
- (59) Wu Q, Ishikawa T, Sirianni R, Tang H, McDonald JG, Yuhanna IS, Thompson B, Girard L, Mineo C, Brekken RA, Umetani M, Euhus DM, Xie Y, Shaul PW. 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep.* 2013;5(3):637-45.
- (60) Zhu D, Shen Z, Liu J, Chen J, Liu Y, Hu C, Li Z, Li Y. The ROS-mediated activation of STAT-3/VEGF signaling is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced angiogenesis in human breast cancer cells. *Toxicol Lett.* 2016;264:79-86.
- (61) Lee WR, Ishikawa T, Umetani M. The interaction between metabolism, cancer and cardiovascular disease, connected by 27-hydroxycholesterol. *Clin Lipidol.* 2014;9(6):617-24.
- (62) Burkard I, von Eckardstein A, Waeber G, Vollenweider P, Rentsch KM. Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis.* 2007;194(1):71-8.
- (63) Karuna R, Holleboom AG, Motazacker MM, Kuivenhoven JA, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Georgopoulos S, van Eck M, van Berkel TJ, von Eckardstein A, Rentsch KM. Plasma levels of 27-hydroxycholesterol in humans and mice with monogenic disturbances of high density lipoprotein metabolism. *Atherosclerosis.* 2011;214(2):448-55.

- (64) Nunes VS, Panzoldo NB, Leança CC, Parra ES, Zago VS, da Silva EJ, Cazita PM, Nakandakare ER, de Faria EC, Quintão EC. Increased 27-hydroxycholesterol plasma level in men with low high density lipoprotein-cholesterol may circumvent their reduced cell cholesterol efflux rate. *Clin Chim Acta*. 2014; 433:169-73.
- (65) El Roz A, Bard JM, Huvelin JM, Nazih H. LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis. *Anticancer Res*. 2012;32(7):3007-13.
- (66) Schimanski S, Wild PJ, Treeck O, Horn F, Sigrüener A, Rudolph C, Blaszyk H, Klinkhammer-Schalke M, Ortmann O, Hartmann A, Schmitz G. Expression of the lipid transporters ABCA3 and ABCA1 is diminished in human breast cancer tissue. *Horm Metab Res*. 2010;42(2):102-9.
- (67) Nieva C, Marro M, Santana-Codina N, Rao S, Petrov D, Sierra A. The lipid phenotype of breast cancer cells characterized by Raman microspectroscopy: towards a stratification of malignancy. *PLoS One*. 2012;7(10): e46456.
- (68) Samadi S, Ghayour-Mobarhan M, Mohammadpour A, Farjami Z, Tabadkani M, Hosseinnia M, Miri M, Heydari-Majd M, Mehramiz M, Rezayi M, Ferns GA, Avan A. High-density lipoprotein functionality and breast cancer: A potential therapeutic target. *J Cell Biochem*. 2019;120(4):5756-5765.
- (69) Fan Y, Ding X, Wang J, Ma F, Yuan P, Li Q, Zhang P, Xu B. Decreased serum HDL at initial diagnosis correlates with worse outcomes for triple-negative breast cancer but not non-TNBCs. *Int J Biol Markers*. 2015;30(2): e200-7.
- (70) Huang X, He D, Ming J, He Y, Zhou C, Ren H, He X, Wang C, Jin J, Ji L, Willard B, Pan B, Zheng L. High-density lipoprotein of patients with breast cancer complicated with type 2 diabetes mellitus promotes cancer cells adhesion to vascular endothelium via ICAM-1 and VCAM-1 upregulation. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;155(3):441-55.
- (71) Rohatgi A, Westertep M, von Eckardstein A, Remaley A, Rye KA. HDL in the 21st Century: A Multifunctional Roadmap for Future HDL Research. *Circulation*. 2021;143(23):2293-309.
- (72) Ganjali S, Banach M, Pirro M, Fras Z, Sahebkar A. HDL and cancer - causality still needs to be confirmed? Update 2020. *Semin Cancer Biol*. 2021; 73:169-77.
- (73) Desai P, Lehman A, Chlebowski RT, Kwan ML, Arun M, Manson JE, Lavasani S, Wasswertheil-Smoller S, Sarto GE, LeBoff M, Cauley J, Cote M, Beebe-Dimmer J, Jay A, Simon MS. Statins and breast cancer stage and mortality in the Women's Health Initiative. *Cancer Causes Control*. 2015;26(4):529-39.

- (74) Ahern TP, Pedersen L, Tarp M, Cronin-Fenton DP, Garne JP, Silliman RA, et al. Statin prescriptions and breast cancer recurrence risk: A Danish nationwide prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(19):1461-8.
- (75) Dalenc F, Iuliano L, Filleron T, Zerbinati C, Voisin M, Arellano C, Chatelut E, Marquet P, Samadi M, Roché H, Poirot M, Silvente-Poirot S. Circulating oxysterol metabolites as potential new surrogate markers in patients with hormone receptor-positive breast cancer: Results of the OXYTAM study. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 169:210-218.
- (76) Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM, Angelone T, Cerra MC, Picard D, Maggiolini M. The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor  $\alpha$ -mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes. *PLoS One.* 2011;6(1):e16631.
- (77) Kloudova A, Guengerich FP, Soucek P. The role of oxysterols in human cancer HHS Public Access. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(7):485-96.
- (78) Wang CW, Huang CC, Chou PH, Chang YP, Wei S, Guengerich FP, Chou YC, Wang SF, Lai PS, Souček P, Ueng YF. 7-ketocholesterol and 27-hydroxycholesterol decreased doxorubicin sensitivity in breast cancer cells: estrogenic activity and mTOR pathway. *Oncotarget.* 2017;8(39):66033-50.
- (79) Kopecka J, Godel M, Riganti C. Cholesterol metabolism: At the cross road between cancer cells and immune environment. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020; 129:105876.
- (80) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
- (81) Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955;34(9):1345-53.
- (82) Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1995;225(1):73-80.
- (83) Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(9):3178-82.
- (84) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- (85) Lofterød T, Mortensen ES, Nalwoga H, Wilsgaard T, Frydenberg H, Risberg T,

Eggen AE, McTiernan A, Aziz S, Wist EA, Stensvold A, Reitan JB, Akslen LA, Thune I. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. *BMC Cancer*. 2018;18(1):654.

(86) His, M., Dartois, L., Fagherazzi, G. et al. Associations between serum lipids and breast cancer incidence and survival in the E3N prospective cohort study. *Cancer Causes Control*. 2017; 28; 77–88.

(87) Jung SM, Kang D, Guallar E, Yu J, Lee JE, Kim SW, Nam SJ, Cho J, Lee SK. Impact of Serum Lipid on Breast Cancer Recurrence. *J Clin Med*. 2020;9(9):2846.

(88) Ni H, Liu H, Gao R. Serum Lipids and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS One*. 2015;10(11): e0142669.

(89) Nowak C, Ärnlov J. A Mendelian randomization study of the effects of blood lipids on breast cancer risk. *Nat Commun*. 2018;9(1):3957.

(90) Moorman PG, Hulka BS, Hiatt RA, Krieger N, Newman B, Vogelman JH, Orentreich N. Association between high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer varies by menopausal status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(6):483-8.

(91) Kapil U, Bhadoria AS, Sareen N, Singh P, Dwivedi SN. Total cholesterol and triglyceride levels in patients with breast cancer. *J Breast Cancer*. 2013;16(1):129-30

(92) Chandler P.D., Song Y., Lin J., Zhang S., Sesso H.D., Mora S., Giovannucci E.L., Rexrode K.E., Moorthy M.V., Li C., et al. Lipid biomarkers and long-term risk of cancer in the Women's Health Study. *Am. J. Clin. Nutr*. 2016; 103:1397–1407.

(93) Fazio S, Pamir N. HDL Particle Size and Functional Heterogeneity. *Circ Res*. 2016;119(6):704-707.

(94) Babashamsi MM, Koukhaloo SZ, Halalkhor S, Salimi A, Babashamsi M. ABCA1 and metabolic syndrome; a review of the ABCA1 role in HDL-VLDL production, insulin-glucose homeostasis, inflammation and obesity. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13(2):1529-1534.

(95) Barter PJ, Rye KA. HDL cholesterol concentration or HDL function: which matters? *Eur Heart J*. 2017;38(32):2487-2489.

(96) Kontush, A. HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease. *Trends Mol. Med*. 2020; 26, 1086–1100.

(97) Adorni MP, Ronda N, Bernini F, Zimetti F. High Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerosis in Cardiovascular Disease: Pathophysiological Aspects and Pharmacological Perspectives. *Cells*. 2021;10(3):574.

- (98) Smith B, Land H. Anticancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell Rep.* 2012;2(3):580-90.
- (99) Wang W, Lokman, NA, Noye, TM, Macpherson AM, Oehler MK, Ricciardelli C. ABCA1 is associated with the development of acquired chemotherapy resistance and predicts poor ovarian cancer outcome. *Cancer Drug Resist.* 2021; 4:485-502.
- ABCA1 and ABCG1 in human triple-negative breast cancer tissues. *Oncol Rep.*(100) Pan H, Zheng Y, Pan Q, Chen H, Chen F, Wu J, Di D. Expression of LXR  $\beta$ , 2019;42(5):1869-77.
- (101) Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2004;91(1):54-69; Krycer JR, Brown AJ. Cholesterol accumulation in prostate cancer: a classic observation from a modern perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1835(2):219-29.
- (102) De Gonzalo-Calvo D, López-Vilaró L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vázquez T, Escuin D, Badimon L, Barnadas A, Lerma E, Llorente-Cortés V. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer.* 2015; 15:460.
- (103) Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol Chem.* 2015;396(1):1-11.
- (104) Gutierrez-Pajares JL, Ben Hassen C, Chevalier S, Frank PG. SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer. *Front Pharmacol.* 2016; 7:338.
- (105) Yuan B, Wu C, Wang X, Wang D, Liu H, Guo L, Li XA, Han J, Feng H High scavenger receptor class B type I expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol.* 2016;37, 3581–3588.
- (106) Danilo C, Gutierrez-Pajares J L, Mainieri MA, Mercier I, Lisanti MP, Frank PG. Scavenger receptor class B type I regulates cellular cholesterol metabolism and cell signaling associated with breast cancer development. *Breast Cancer Res.*2013; 15: R87.
- (107) Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams T M. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am. J. Pathol.* 2011;178, 402–12.
- (108) Cao WM, Murao K, Imachi H, Yu X, Abe H, Yamauchi A, Niimi M, Miyauchi A, Wong NC, Ishida T. A mutant high-density lipoprotein receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64, 1515–21.
- (109) Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, *Nat Cell Biol,* 2011; 13:423-33.

- (110) Zografos E, Zagouri F, Kalapanida D, Zakopoulou R, Kyriazoglou A, Apostolidou K, Gazouli M, Dimopoulos MA. Prognostic role of microRNAs in breast cancer: A systematic review. *Oncotarget* 2019; 10:7156-78.
- (111) Abolghasemi M, Tehrani SS, Yousefi T, Karimian A, Mahmoodpoor A, Ghamari A, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M, Kafil HS, Bastami M, Edalati M, Eyvazi S, Naghizadeh M, Targhazeh N, Yousefi B, Safa A, Majidinia M, Rameshknia V. MicroRNAs in breast cancer: Roles, functions, and mechanism of actions. *J Cell Physiol.* 2020;235(6):5008-5029.
- (112) Cuesta Torres LF, Zhu W, Öhring G, Larsson R, Patel M, Wiese CB, Rye KA, Vickers KC, Tabet F. High-density lipoproteins induce miR-223-3p biogenesis and export from myeloid cells: Role of scavenger receptor BI-mediated lipid transfer. *Atherosclerosis.* 2019; 286:20-29.
- (113) Castilho G, Okuda LS, Pinto RS, Iborra RT, Nakandakare ER, Santos CX, Laurindo FR, Passarelli M. ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycated albumin - reversal by a chemical chaperone. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(7):1078-86.
- (114) Iborra RT, Machado-Lima A, Okuda LS, Pinto PR, Nakandakare ER, Machado UF, Correa-Giannella ML, Pickford R, Woods T, Brimble MA, Rye KA, Lu R, Yokoyama S, Passarelli M. AGE-albumin enhances ABCA1 degradation by ubiquitin-proteasome and lysosomal pathways in macrophages. *J Diabetes Complications.* 2018;32(1):1-10.
- (115) Nobécourt E, Tabet F, Lambert G, Puranik R, Bao S, Yan L, Davies MJ, Brown BE, Jenkins AJ, Dusting GJ, Bonnet DJ, Curtiss LK, Barter PJ, Rye KA. Nonenzymatic glycation impairs the antiinflammatory properties of apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):766-72.
- (116) Park KH, Jang W, Kim KY, Kim JR, Cho KH. Fructated apolipoprotein A-I showed severe structural modification and loss of beneficial functions in lipid-free and lipid-bound state with acceleration of atherosclerosis and senescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392(3):295-300.
- (117) Shao B. Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(3):490-501.
- (118) Kon V, Yang HC, Smith LE, Vickers KC, Linton MF. High-Density Lipoproteins in Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22(15):8201.
- (119) Pan B, Ren H, Ma Y, Liu D, Yu B, Ji L, Pan L, Li J, Yang L, Lv X, Shen X, Chen B, Zhang Y, Willard B, He Y, Zheng L. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus elevates the capability of promoting migration and invasion of breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2012;131(1):70-82.

- (120) Schröter D, Höhn A. Role of Advanced Glycation End Products in Carcinogenesis and their Therapeutic Implications. *Curr Pharm Des.* 2018;24(44):5245-5251.
- (121) Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med.* 2007;7(8):777-89.
- (122) Chan K, Turner TF, Varner H, Singh S, Uribarri J, Garrett-Mayer E, Armeson KE, Hilton EJ, Clair MJ, Taylor MH, Abbott AM, Findlay VJ, Peterson LL, Magwood G, Turner DP. Advanced glycation end products are elevated in estrogen receptor-positive breast cancer patients, alter response to therapy, and can be targeted by lifestyle intervention. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;173(3):559-71.
- (123) DeBerardinis, R.J., Chandel, N.S. We need to talk about the Warburg effect. *Nat Metab.* 2020; 2: 127-9.
- (124) Leone A, Nigro C, Nicolò A, Prevezano I, Formisano P, Beguinot F, Miele C. The Dual-Role of Methylglyoxal in Tumor Progression - Novel Therapeutic Approaches. *Front Oncol.* 2021;11: 645686.
- (125) Sawada MIBAC, Ferreira GD, Passarelli M. Cholesterol derivatives and breast cancer: oxysterols driving tumor growth and metastasis. *Biomark Med.* 2020;14(14):1299-1302.

**APÊNDICE A – Frequência dos tipos moleculares de câncer de mama  
segundo o estadiamento clínico e o estado menopáusico**

**Tipo molecular de câncer de mama: luminal A**

			Pré-menopausa	Pós-menopausa	Total
<b>Estágios da doença</b>	<b>I</b>	<b>n</b>	6	20	26
		<b>% estágio</b>	23,1	76,9	100
		<b>% estado menopáusico</b>	46,2	51,3	50
		<b>% do total</b>	11,5	38,5	50
	<b>II</b>	<b>n</b>	5	14	19
		<b>% estágio</b>	26,3	73,7	100
		<b>% estado menopáusico</b>	38,5	35,9	36,5
		<b>% do total</b>	9,6	26,9	36,5
	<b>III</b>	<b>n</b>	1	5	6
		<b>% estágio</b>	16,7	83,3	100
		<b>% estado menopáusico</b>	7,7	12,8	11,5
		<b>% do total</b>	1,9	9,6	11,5
<b>IV</b>	<b>n</b>	1	0	1	
	<b>% estágio</b>	100	0	100	
	<b>% estado menopáusico</b>	7,7	0	1,9	
	<b>% do total</b>	1,9	0	1,9	
<b>Total</b>	<b>n</b>	13	39	52*	
	<b>% estágio</b>	25	75	100	
	<b>% estado menopáusico</b>	100	100	100	
	<b>% do total</b>	25	75	100	

\* Um caso não possui classificação quanto ao estadiamento da doença e ao estado menopáusico.

**Tipo molecular de câncer de mama: luminal B**

			Pré-menopausa	Pós-menopausa	Total
--	--	--	---------------	---------------	-------

Estágios I		n	9	12	21	da doença	% estágio	42,9	57,1	100
							% estado menopáusico	29	30,8	30
							% do total	12,9	17,1	30
	II	n	15	13	28					
							% estágio	53,6	46,4	100
							% estado menopáusico	48,4	33,3	40
							% do total	21,4	18,6	40
	III	n	6	7	13					
							% estágio	46,2	53,8	100
							% estado menopáusico	19,4	17,9	18,6
							% do total	8,6	10	18,6
	IV	n	1	7	8					
							% estágio	12,5	87,5	100
							% estado menopáusico	3,2	17,9	11,4
							% do total	1,4	10	11,4
<b>Total</b>		n						31	39	70
							% estágio	44,3	55,7	100
							% estado menopáusico	100	100	100
							% do total	44,3	55,7	100

### Tipo molecular de câncer de mama: HER2

				Pré-menopausa	Pós-menopaus	Total a	
Estágios da doença	I	n		2	5	7	
		% estágio		28,6	71,4	100	
		% estado menopáusico		20	23,8	22,6	
		% do total		6,5	16,1	22,6	
	II	n	4	7	11		
		% estágio			36,4	63,6	100
		% estado menopáusico			40	33,3	35,5
		% do total			12,9	22,6	35,5
	III	n	2	8	10		
		% estágio			20	80	100
		% estado menopáusico			20	38,1	32,3
		% do total			6,5	25,8	32,3
IV	n	2	1	3			
	% estágio			66,7	33,3	100	
	% estado menopáusico			20	4,8	9,7	
	% do total			6,5	3,2	9,7	
Total	n			10	21	31	
	% estágio			32,3	67,7	100	
	% estado menopáusico			100	100	100	
	% do total			32,3	67,7	100	

**Tipo molecular de câncer de mama: triplo negativo**

					Pré-menopausa	Pós-menopausa	Total	
Estágios da doença	I	n			3	3	6	
		% estágio			50	50	100	
		% estado menopáusico			30	16,7	21,4	
		% do total			10,7	10,7	21,4	
	II	n	2	4	6			
		% estágio				33,3	66,7	100
		% estado menopáusico				20	22,2	21,4
		% do total				7,1	14,3	21,4
	III	n	2	7	9			
		% estágio				22,2	77,8	100
		% estado menopáusico				20	38,9	32,1
		% do total				7,1	25	32,1
IV	n	3	4	7				
	% estágio				42,9	57,1	100	
	% estado menopáusico				30	22,2	25	
	% do total				10,7	14,3	25	
Total	n				10	18	28*	
	% estágio				35,7	64,3	100	
	% estado menopáusico				100	100	100	
	% do total				35,7	64,3	100	

\* Um caso não possui classificação quanto ao estadiamento da doença e ao estado menopáusico.

**APÊNDICE B – Frequência do câncer de mama segundo estágios  
agrupados e estado menopáusico**

Estágios		Pré-menopausa	Pós-menopausa	Total
<b>I e II</b>	n	45	77	122
	% no estágio menopáusico	36,9%	63,1%	100%
	% do total	24,5%	41,8%	66,3%
<b>III e IV</b>	n	20	42	62
	% no estágio menopáusico	32,3%	67,7%	100%
	% no total	10,9%	22,8%	33,7%
<b>Total</b>	n	65	119	184
	% no estágio menopáusico	35,3%	64,7%	100%
	% do total	35,3%	64,7%	100%

As frequências foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado ( $X^2=0,385$ ;  $P=0,535$ ).

## APÊNDICE C – Perfil de lípides plasmáticos por tipos moleculares de câncer de mama.

	LA	LB	HER2	TN	P
n*	46	65	26	26	
Idade (anos)	61 (51-61)	53 (47-61)	55 (47-61)	56 (41-61)	0,058
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (24-31)	28 (25-31)	26 (24-31)	28 (24-31)	0,732
CT (mg/dL)	<b>193</b> <b>(162-228)</b>	<b>173</b> <b>(155-205)</b>	<b>173</b> <b>(151-193)</b>	<b>198</b> <b>(173-214)</b>	<b>0,022</b>
TG (mg/dL)	103 (66-139)	<b>84</b> <b>(67-110)</b>	<b>82</b> <b>(63-105)</b>	<b>102</b> <b>(91-134)</b>	<b>0,026</b>
apoB (mg/dL)	<b>129</b> <b>(90-151)</b>	<b>98</b> <b>(81-123)</b>	<b>100</b> <b>(81-127)</b>	<b>134</b> <b>(102-158)</b>	<b>0,005</b>
HDLc (mg/dL)	41 (34-49)	42 (33-53)	42 (32-52)	42 (36-50)	0,997
VLDLc (mg/dL)	21 (13-28)	<b>17</b> <b>(13-22)</b>	<b>16</b> <b>(13-21)</b>	<b>20</b> <b>(18-27)</b>	<b>0,026</b>
LDLc (mg/dL)	123 (99-155)	111 (90-138)	117 (85-134)	127 (98-148)	0,111
não-HDLc (mg/dL)	<b>147</b> <b>(121-184)</b>	<b>129</b> <b>(104-162)</b>	<b>135</b> <b>(105-151)</b>	<b>155</b> <b>(130-174)</b>	<b>0,012</b>
CT/apoB	1,7 (1,4-2,0)	1,8 (1,5-2,1)	1,8 (1,5-2,0)	1,5 (1,3-2,0)	0,313
TG/HDLc	2,3 (1,3-3,4)	1,9 (1,3-3,1)	1,7 (1,3-3,2)	2,5 (2,0-3,4)	0,311

\* número de casos válidos para análise das variáveis. LA=luminal A; LB=luminal B; TN=triplo negativo. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskall-Wallis*; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

## APÊNDICE D – Perfil de lípides plasmáticos por estágio da doença

### Estágios da doença

	I	II	III	IV	P
n *	57	60	31	16	
Idade (anos)	60 (49-64)	53 (46-61)	56 (51-61)	55 (47-63)	0,250
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (24-31)	28 (25-31)	28 (26-31)	25 (23-30)	0,465
CT (mg/dL)	187 (162-218)	179 (156-201)	189 (167-208)	183 (154-241)	0,591
TG (mg/dL)	94 (64-117)	90 (72-118)	92 (73-115)	84 (60-111)	0,843

<b>apoB (mg/dL)</b>	105 (81-138)	106 (87-134)	109 (84-141)	105 (84-150)	0,970
<b>HDLc (mg/dL)</b>	42 (33-51)	42 (34-52)	46 (39-55)	41 (33-45)	0,422
<b>VLDLc (mg/dL)</b>	19 (13-23)	18 (14-24)	18 (15-23)	17 (12-22)	0,843
<b>LDLc (mg/dL)</b>	121 (98-146)	107 (92-136)	118 (97-139)	117 (98-172)	0,385
<b>não-HDLc (mg/dL)</b>	140 (118-169)	132 (105-158)	139 (116-163)	132 (108-196)	0,513
<b>CT/apoB</b>	1,8 (1,4-2,1)	1,7 (1,4-2,0)	1,7 (1,4-2,0)	1,6 (1,2-2,0)	0,722
<b>TG/HDLc</b>	1,9 (1,5-3,2)	2,2 (1,3-3,3)	2,1 (1,0-3,3)	2,4 (1,6-2,7)	0,976

\*número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskall-Wallis* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

#### Estágios I e II versus III e IV

	I, II	III, IV	P
<b>n *</b>	112	52	
<b>Idade (anos)</b>	56 (48-63)	55 (48-62)	0,893
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27 (24-31)	27 (24-31)	0,464
<b>CT (mg/dL)</b>	182 (157-208)	188 (163-209)	0,460
<b>TG (mg/dL)</b>	91 (67-117)	94 (70-114)	0,948
<b>apoB (mg/dL)</b>	105 (82-137)	109 (85-180)	0,416
<b>HDLc (mg/dL)</b>	42 (33-51)	44 (36-53)	0,273
<b>VLDLc (mg/dL)</b>	18 (13-23)	19 (14-23)	0,948
<b>LDLc (mg/dL)</b>	116 (95-143)	116 (96-144)	0,675
<b>não-HDL (mg/dL)</b>	135 (111-163)	137 (113-164)	0,850
<b>CT/apoB</b>	1,8 (1,4-2,0)	1,7 (1,4-2,0)	0,386
<b>TG/HDLc</b>	2,1 (1,4-3,2)	2,3 (1,2-3,2)	0,732

\*número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; HDLc = colesterol na lipoproteína de densidade alta; VLDLc = colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa; LDLc = colesterol na lipoproteína de densidade baixa. As comparações foram feitas pelo teste de *Mann-Whitney* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

## APÊNDICE E – Composição da HDL em mulheres com câncer de mama e em controles

### Lípides e apoA-I

	CONTROLE	CÂNCER DE MAMA	P
n*	148	181	
Idade (anos)	<b>50 (38-59)</b>	<b>55(48-63)</b>	<b>&lt;0,001</b>
IMC(kg/m <sup>2</sup> )	28 (25-31)	27(24-31)	0,519
HDL-CT (mg/dL)	<b>46 (35-57)</b>	<b>39 (30-52)</b>	<i>P</i> <0,001
HDL-TG (mg/dL)	15 (11-22)	15(11-57)	0,068
HDL-FL (mg/dL)	<b>99 (80-131)</b>	<b>90 (76-119)</b>	<i>P</i> =0,032
<b>HDL-apoA-I (mg/dL)</b>	104 (84-140)	108 (79-137)	0,712

\* número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípides; apo A-I = apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Valores ajustados pela idade.

**APÊNDICE F – Perfil lipídico em subgrupo de mulheres com quantificação de OC na HDL**

	CONTROLE		CÂNCER		P
	n		n		
Idade (anos)	81	47 (36-58)	80	55 (47-63)	<0,001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	81	27 (24-30)	80	27 (24-30)	0,519
CT (mg/dL)	81	171(150-199)	69	173 (154-195)	0,822
TG (mg/dL)	81	87 (60-122)	69	90 (68-114)	0,477
ApoB (mg/dL)	81	120 (100-151)	69	103 (82-139)	0,001
HDLc (mg/dL)	81	44 (35-52)	69	40 (32-48)	0,078
VLDL (mg/dL)	81	17 (12-24)	69	18 (14-23)	0,477
LDL (mg/dL)	81	108 (92-126)	69	111 (94-131)	0,591
Não HDL (mg/dL)	81	124 (107-148)	69	133 (115-156)	0,263
CT/apoB (mg/dL)	81	1,4 (1,3-1,5)	69	1,7 (1,3-2,0)	<0,001
TG/HDL (mg/dL)	81	1,9 (1,2-3,0)	69	2,2 (1,6-3,3)	0,119
HDL-C (mg/dL)	81	42 (32-57)	80	38 (30-46)	0,046
HDL-TG (mg/dL)	81	14 (11-18)	80	12 (10-14)	<0,001
HDL-FL (mg/dL)	81	94 (73-124)	80	81 (67-101)	0,002
HDL-apoA-I (mg/dL)	81	105 (78-150)	80	101 (75-126)	0,116

Número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípides; apo A-I = apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). Os valores de P foram ajustados pela idade.

LA	LB	HER2	TN	P
----	----	------	----	---

n*	51	68	30	29	
Idade (anos)	61(52-65)	53(47-61)	55(47-61)	56(42-61)	0,058
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27(24-31)	28(25-31)	27(24-31)	28(24-31)	0,732
HDL-CT (mg/dL)	37(29-49)	38(28-52)	40(30-46)	44(27-57)	0,831
HDL-TG (mg/dL)	<b>15(12-38)</b>	<b>16(11-59)</b>	<b>13(10-17)</b>	<b>26(14-87)</b>	<b>0,019<sup>#</sup></b>
HDL-FL (mg/dL)	91(71-119)	87 (77-121)	95(80-120)	93(77-116)	0,722
HDL-apoA-I (mg/dL)	113(82-141)	107(73-146)	107(81-136)	102(85-120)	0,760

## APÊNDICE G – Composição da HDL por tipos moleculares

### Composição da HDL segundo os tipos moleculares \*

número de casos válidos para análise das variáveis. LA=luminal A; LB=luminal B; TN=triplo negativo; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoA-I=apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). # **TN vs. HER2=0,002; HER2 vs. LB=0,046; LA vs. TN=0,040; LB vs. TN=0,097; HER2 vs.LA=0,156; LA vs. LB=0,550.**

#### **Composição da HDL: comparação entre tumores luminais, HER2 e triplo negativos**

	Luminais	HER2	TN	P
n*	120	31	29	
Idade (anos)	56(49-64)	55(47-61)	56(42-61)	0,416
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27(25-31)	27(24-31)	28(24-31)	0,685

HDL-CT (mg/dL)	38(29-51)	41(30-46)	44(27-57)	0,782
HDL-TG (mg/dL)	<b>16(11-52)</b>	<b>13(10-17)</b>	<b>26(14-87)</b>	<b>0,007#</b>
HDL-FL (mg/dL)	90 (73- 121)	96 (80- 119)	93(77-116)	0,582
HDL-apoA-I (mg/dL)	111 (78- 142)	106 (82- 135)	101 (85- 120)	0,704

\*número de casos válidos para análise das variáveis. TN=triplo negativo; IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoA-I=apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskall-Wallis* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). #**HER2 vs. TN=0,002; HER2 vs. Lum=0,030; Lum vs. TN=0,070.**

**Composição da HDL: triplo negativo *versus* outros tipos moleculares**

	TN	Outros	P
n *	29	151	
Idade (anos)	56 (42-61)	55 (48-63)	0,296
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28 (24-31)	27 (24-31)	0,914
HDL-CT (mg/dL)	44 (27-57)	39 (30-50)	0,484
HDL-TG (mg/dL)	<b>26 (14-87)</b>	<b>15 (11-45)</b>	<b>0,022</b>
HDL-FL (mg/dL)	93 (77-116)	90 (76-121)	0,893

\* número de casos válidos para análise das variáveis. TN=triplo negativo; CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípidos; apo A-I = apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

## APÊNDICE H – Composição da HDL por estágios da doença

### Composição da HDL nos 4 estágios da doença

	I	II	III	IV	P
n *	56	66	38	19	
Idade (anos)	60 (49-64)	53 (46-61)	56 (51-61)	55 (47-63)	0,250
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (24-31)	28 (25-31)	28 (26-31)	25 (23-30)	0,465
HDL-CT (mg/dL)	44 (29-50)	38 (30-50)	38 (25-65)	37 (31-51)	0,881
HDL-TG (mg/dL)	15 (12-42)	14 (11-53)	36 (13-86)	15 (10-57)	0,105
HDL-FL (mg/dL)	90 (76-118)	88 (76-114)	114 (74-124)	86 (78-97)	0,487
HDL-apoA-I (mg/dL)	115 (83-139)	103 (78-135)	110 (75-140)	104 (74-143)	0,781

\*número de casos válidos para análise das variáveis. IMC = índice de massa corporal; CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoA-I=apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de *Kruskal-Wallis* com significância de 0,05. Dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

**Composição da HDL: estágios I e II versus III e IV**

	I, II	III, IV	P
n *	117	62	
Idade (anos)	56 (48-63)	55 (48-62)	0,893
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27 (24-31)	27 (24-33)	0,464
HDL-C (mg/dL)	41 (16-50)	38 (29-71)	0,734
HDL-TG (mg/dL)	14 (11-38)	25 (11-105)	0,058
HDL-FL (mg/dL)	89 (76-117)	96 (78-153)	0,187
HDL-apoA-I (mg/dL)	108 (80-139)	103 (74-134)	0,452

\*número de casos válidos para análise das variáveis. CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípidos; apo A-I = apolipoproteína A-I. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%).

## APÊNDICE I – Efluxo de <sup>14</sup>C-colesterol segundo tipo molecular e estágio da doença

Estágios		LA	LB	HER2	TN	Total
I, II	n	36	32	14	7	89
	% no estágio	40,4%	36%	15,7%	7,9%	100%
	% do total	28,8%	25,6%	11,2%	5,6%	71,2%
III, IV	n	5	13	11	7	36
	% no estágio	13,9%	36,1%	30,6%	19,4%	100%
	% do total	4	10,4%	8,8%	5,6%	28,8%
<b>Total</b>	n	41%	45	25	14	125
	% no estágio	32,8%	36%	20%	11,2%	100%
	% do total	32,8%	36%	20%	11,2%	100%

LA= luminal A; LB= luminal B; TN= triplo negativo. As frequências foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2=11,398$ ;  $P=0,01$ ).

## **ANEXO A - Aprovações dos Comitês de Ética**

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCUIAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA - ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR E O PROGNÓSTICO DA DOENÇA

**Pesquisador:** Marisa Passarelli

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 04096218.5.0000.5511

**Instituição Proponente:** ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.139.460

#### Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do projeto, Objetivo da pesquisa, Avaliação dos riscos e benefícios foram retiradas do documento Data de Submissão do Projeto: 23/01/2019 Nome do Arquivo: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1261822.pdf.

Em que se lê no item resumo. A etiopatogenia do câncer de mama é diversa e a classificação molecular dos tumores e o cálculo de escore de recorrência são utilizados como base para o prognóstico e escolha terapêutica. Os produtos de glicação avançada (AGEs) que se formam frente ao maior fluxo na via glicolítica e

inflamação são prevalentes em diversos tumores e se associam com o prognóstico do câncer de mama. Os AGEs aumentam o insulto glicoxidativo e perturbam a homeostase de lípidos, em parte, por diminuírem o conteúdo do receptor de HDL, ABCA-1. Isto prejudica a remoção de colesterol, favorecendo o acúmulo intracelular de óxidos de colesterol, que se vinculam ao potencial de crescimento e metástase de alguns tumores de mama. Além disso, as partículas de HDL, independentemente do HDL colesterol podem potencialmente contribuir com o desenvolvimento tumoral. No presente projeto, pretende-se avaliar primariamente em mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama invasivo: a) a associação entre a concentração plasmática de óxidos de colesterol, AGEs e seus componentes de destoxificação com o prognóstico da doença,

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**CEP:** 01 504-001

**Telefone:** (11)3385 9010

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE  
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 3.139.460

de acordo com sua classificação molecular, b) a concentração de óxidos de colesterol nas subfrações lipoproteínas de alta densidade (HDL2 e HDL3) e sua habilidade em remover colesterol celular e inibir a oxidação. Como objetivo secundário, pretende-se avaliar a associação entre as variáveis acima descritas e o escore de recorrência de 21 genes (Oncotype DX® – Recurrence Score). Para tanto, serão incluídas pacientes do sexo feminino, entre 18 e 70 anos de idade, com diagnóstico recente de câncer de mama, virgens de tratamento e com a classificação molecular e estadiamento prognóstico clínico do tumor de I e II. Mulheres saudáveis na mesma faixa etária, pareadas por idade e índice de massa corporal serão incluídas como grupo controle. As concentrações de AGEs, receptor solúvel de AGE e glicoxalase 1 serão determinadas no plasma por ELISA e as de óxidos de colesterol, no plasma e nas frações de HDL2 e HDL3, por espectrometria de massa, e associadas com o prognóstico do tumor. Além disso, as HDL isoladas serão testadas quanto à sua habilidade em remover colesterol celular e inibir a oxidação. Os resultados serão importantes para compreensão do envolvimento dos AGEs e óxidos de colesterol na evolução do câncer de mama, de acordo com o predito por sua classificação molecular e análise genética, com foco especial na função das HDL.

**Metodologia Proposta:** Classificação molecular do tumor de mama A classificação molecular do tumor das pacientes incluídas no estudo será obtida do prontuário médico, junto ao Hospital Pérola Byington. As análises dos subtipos moleculares serão realizadas após remoção cirúrgica do tecido tumoral por imunohistoquímica

de acordo com parâmetros do American College of Pathologists. Análise do escore de recorrência - plataforma Oncotype DX® Os dados de escore de recorrência analisados pela plataforma Oncotype DX® serão obtidos do prontuário em um subgrupo de pacientes junto ao Hospital Pérola Byington (esta análise faz parte de estudo em andamento previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Pérola Byington, sob a

responsabilidade do Dr. André Maltar e Dr. Luiz Henrique Gehrim) Obtenção de amostras de plasma De ambos os grupos, serão colhidos 15 mL de sangue, por punção venosa, após jejum de 12 h, previamente ao tratamento cirúrgico e após 30 dias do pós-operatório. O plasma será, imediatamente, obtido por centrifugação a 4°C, 20 min, 3000 rpm. Para obtenção da fração de plasma que contém apenas as HDLs, as lipoproteínas que contém apoB (VLDL e LDL) serão precipitadas por meio da adição de solução de sulfato de dextrana/cloreto de magnésio (1:1) ao plasma (100

L/mL). Após incubação a temperatura ambiente por 30min, o plasma será isolado mediante centrifugação, durante 20 min, 3000 rpm. As amostras de plasma total e plasma contendo apenas

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

**CEP:** 01504-001

**UF:** SP

**Município:** SAC PAULO

**Telefone:** (11)3385-9010

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE  
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 3.139.460

HDL serão mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os lípides plasmáticos (colesterol total, HDL colesterol e triglicérides), a glicemia, uréia, creatinina, enzimas hepáticas (alanina e aspartato aminotransferase) serão determinados por métodos enzimáticos colorimétricos (Roche do Brasil). A hemoglobina glicada (HbA1c) será determinada por cromatografia. Determinação de AGEs totais, carboximetil-lisina e RAGE

solúvel no plasma O conteúdo plasmático de AGE total (Estuche de ELISA para la cuantificación de Productos Finales de Glicación Avanzada, Lamider SA, Mexico DF, Mexico), CML (CircuLex CML/N-Carboxymethyl)lysine ELISA), sRAGE (R&D System, Minneapolis, Minnesota, EUA) e esRAGE (B-Bridge Int, santa Clara, Califórnia, EUA) será determinado por ensaio imunoenzimático - ELISA. Determinação de glicoxalase 1 no

plasma A atividade plasmática da glicoxalase 1 será determinada por kit enzimático colorimétrico (MAK-114-1KT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Isolamento das subfrações de HDL do plasma: As subfrações de HDL 2 e HDL 3 serão isoladas do plasma, imediatamente após sua obtenção, por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade. Após diálise contra solução de tampão fosfato contendo EDTA, serão armazenadas em solução de sacarose a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Quantificação de óxidos de colesterol no plasma total e na HDL por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS): A massa dos óxidos de colesterol será determinada em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS) (Shimadzu GCMS-QP2010) utilizando a versão 2.5 do software GCMS solution. Remoção de colesterol celular mediada pelo soro

ou HDL isolada das pacientes Serão utilizados macrófagos diferenciados de células obtidas da medula óssea de camundongos (BMDM). Após confluência, os macrófagos serão incubados com DMEM (Low Glucose, Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescido com 50 mcg de LDL acetilada/mL e 0,3 Ci de  $^{14}\text{C}$ -colesterol/mL (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 48 h. Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato as células serão tratadas, por 18h, com DMEM/FAFA para garantir o equilíbrio do pool intracelular de colesterol radioativo. Após lavagem com PBS/FAFA, as células serão incubadas com 0,2% de soro das pacientes e controles por 4 h ou com HDL isoladas (50 mcg/mL), por 6 h. Atividade antioxidante de HDL: será testada mediante

incubação com LDL e sulfato de cobre para determinação do tempo de resistência das LDL contra oxidação.

Hipótese: Os tumores mamários malignos podem expressar ou não receptores para estrogênio e/ou progesterona, além do receptor ERB2(HER-2), com implicações prognósticas e terapêuticas

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

**CEP:** 01.504-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-9010

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE  
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 3.139.460

reconhecidas para cada tipo molecular. A evolução clínica das neoplasias mamárias tende a seguir a história natural de cada tipo molecular, embora os fatores prognósticos clássicos nem sempre sejam suficientes para compreender o comportamento de cada caso, como as recaídas. Recentemente, testes de análise genética realizados em neoplasias mamárias têm sido usados na predição da recorrência tumoral, suscitando terapêutica personalizada para cada paciente. Até o momento não há evidências da possível ligação entre os óxidos de colesterol circulantes, principalmente na fração de HDL, com a concentração sérica de AGEs em pacientes portadoras de câncer de mama com diferentes classificações moleculares. Nossa hipótese é de que os AGEs e seus sistemas contrarregulatórios (RAGE solúvel e enzima glioxalase 1) e os óxidos de colesterol possam associar-se ao pior prognóstico de pacientes com tumor de mama com diferentes classificações moleculares. Outro questionamento é se estas variáveis metabólicas de alguma forma se correlacionam com o escore de recorrência tumoral. Os resultados serão importantes para compreensão do envolvimento dos AGEs e óxidos de colesterol na evolução do câncer de mama, de acordo com o predito por sua classificação molecular e análise genética, com foco especial na função as HDL.

**Crêteros de inclusãõ:** Para tanto, serãõ incluídas pacientes do sexo feminino, entre 18 e 70 anos de idade, com diagnóstico recente de câncêr de mama, virgens de tratamento e com a classificaçãõ molecular e estadiamento prognõstico clínico do tumor de I e II. Mulheres saudáveis na mesma faixa etária, pareadas por idade e índice de massa corporal serãõ incluídas como grupo controle.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Avaliar em mulheres recém diagnosticadas com câncêr de mama invasivo, estágios I e II: - a associaçãõ entre a concentraçãõ plasmática de óxidos de colesterol, produtos de glicaçãõ avançada, glioxalase 1 e receptor solúvel de AGE com o prognõstico da doençã de acordo com sua classificaçãõ molecular ; - a concentraçãõ de óxidos de colesterol nas subfrações lipoproteínas de alta densidade (HDL2 e HDL3) e sua habilidade em remover colesterol celular e inibir a oxidaçãõ; e- a relaçãõ entre as variáveis metabólicas supracitadas e o escore de recorrência de 21 genes (Oncotype DX – Recurrence score).

#### **Avaliaçãõ dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Os riscos e desconfortos da coleta de sangue, caso ocorram, serãõ baixos e podem incluir:

**Endereçõ:** VERGUEIRO nº 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

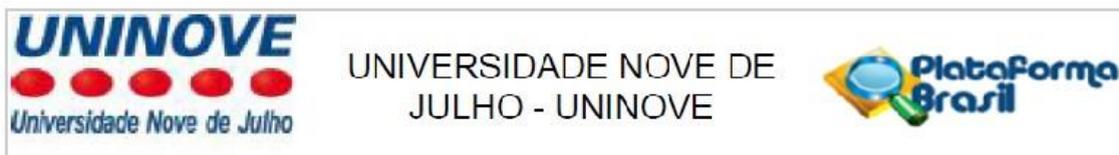
**CEP:** 01.504 001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-9010

**E-mail:** comitedeetica@uninove.br



Continuação do Parecer: 3.139.460

dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa (hematoma), que desaparecerá em poucos dias.

Benefícios. Não há benefícios diretos aos participantes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é adequado em termos éticos. Ocorrerá a coleta de material biológico das referidas pacientes e esta explicitado no TCLE o destino do material. As pacientes serão avisadas caso as amostras sejam utilizadas para análises futuras.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Incluir o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na plataforma Brasil como instituição co-participante

PENDÊNCIA ATENDIDA

- No TCLE, no item garantia de acesso o pesquisador deve informar pelo menos um telefone celular.

PENDÊNCIA ATENDIDA

O Pesquisador deve incluir no TCLE os benefícios da pesquisa.

PENDÊNCIA ATENDIDA

- O pesquisador deve incluir no TCI F os dados do CFP Uninove

PENDÊNCIA ATENDIDA

**Recomendações:**

Os Comitês de ética foram incluídos na Plataforma Brasil:

- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

- CENTRO DE ESTUDO E PESQUISA DO HOSPITAL PEROLA BYINGTON (CNPJ 10.405.640/0001-35).

Na Plataforma Brasil não é possível visualizar o CNPJ do Comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os pesquisadores acompanhar o andamento do processo na Plataforma Brasil para saber se o referido projeto foi devidamente encaminhado para avaliação desse Comitê.

**Endereço:** VERGUEIRO II° 235/249

**Bairro:** LIBERDADE

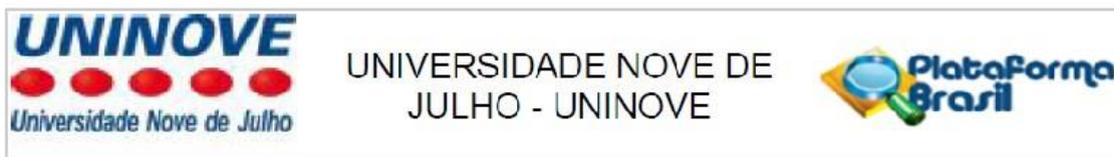
**CEP:** 01.504-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-9010

**E-mail:** [cmitedeetica@uninove.br](mailto:cmitedeetica@uninove.br)



Continuação do Parecer: 3.139.400

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado. Todas as pendências foram atendidas pelos pesquisadores.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O pesquisador deverá se apresentar na instituição de realização da pesquisa (que autorizou a realização do estudo) para início da coleta dos dados.

O participante da pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CFP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

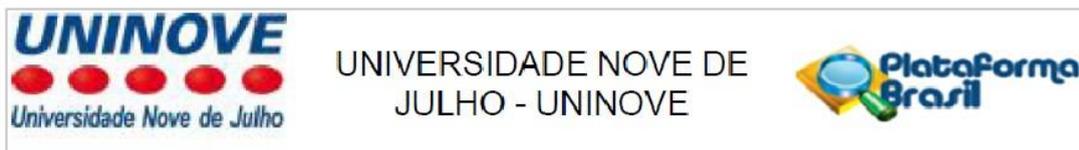
Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 466/12 item X1. 2. f).

De acordo com a Res. CNS 466/12, X.3.b), o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1261822.pdf	23/01/2019 13:20:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	tcle_pacientes.pdf	23/01/2019 13:19:45	Marisa Passarelli	Aceito

**Endereço:** VERGUEIRO nº 235/249  
**Bairro:** LIBERDADE **CEP:** 01.504-001  
**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO  
**Telefone:** (11)3385-9010 **E-mail:** comitedeetica@uninove.br



Continuação do Parecer: 3.139.460

Justificativa de Ausência	tcle_pacientes.pdf	23/01/2019 13:19:45	Marisa Passarelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_controle.pdf	23/01/2019 13:19:28	Marisa Passarelli	Aceito
Outros	resposta_parecer.pdf	21/01/2019 09:56:08	Marisa Passarelli	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	22/11/2018 13:44:02	Marisa Passarelli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CoparticipacaoPByington.pdf	22/11/2018 13:39:02	Marisa Passarelli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofinal.pdf	22/11/2018 13:38:20	Marisa Passarelli	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoMPassarelli.pdf	22/11/2018 13:31:14	Marisa Passarelli	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 10 de Fevereiro de 2019

---

**Assinado por:**

**Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana  
(Coordenador(a))**

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCULAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA - ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR E O PROGNÓSTICO DA DOENÇA

**Pesquisador:** Marisa Passarelli

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 04096218.5.3002.0065

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.491.261

#### Apresentação do Projeto:

Considerando que vários fatores contribuem para câncer de mama, como histórico familiar, tabagismo, obesidade, entre outros. Neste estudo, pretende-se avaliar, no sangue, a concentração de derivados do colesterol e componentes que geram inflamação e analisar se estes compostos estão associados com o desenvolvimento e evolução do câncer de mama. Apesar de até o momento não haver evidências da possível ligação entre os óxidos de colesterol circulantes, principalmente na fração de HDL, com a concentração sérica de AGEs (produtos de glicação avançada) em pacientes portadoras de câncer de mama com diferentes classificações moleculares.

O presente estudo tem por hipótese de que os AGEs e seus sistemas contrarregulatórios (RAGE solúvel e enzima glicoxalase 1) e os óxidos de colesterol, possam associar-se ao pior prognóstico de pacientes com tumor de mama com diferentes classificações moleculares. Será desenvolvido na Universidade Nove de Julho UNINOVE, como parte das teses de doutorado das alunas Maria Isabela BAC Sawada e Daniello Cazoni, junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, com a colaboração do Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM) e do Laboratório de Lipídeos (LIM10) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 261 21º andar sala 36  
**Bairro:** PACAFMRLI **CEP:** 01.246-903  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

Continuação do Parecer: 3.491.261

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama invasivo, estágios I e II:

- a associação entre a concentração plasmática de óxidos de colesterol, produtos de glicação avançada, glioxalase 1 e receptor solúvel de AGE com o prognóstico da doença de acordo com sua classificação molecular ;
- concentração de óxidos de colesterol nas subfrações lipoproteínas de alta densidade (HDL2 e HDL3) e sua habilidade em remover colesterol celular e inibir a oxidação;
- a relação entre as variáveis metabólicas supracitadas e o escore de recorrência de 21 genes (Oncotype DX – Recurrence score).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e desconfortos da coleta de sangue, caso ocorram, serão pequenos e podem incluir: dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa (hematoma).

Benefícios: Não há benefícios diretos aos participantes

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de relato, onde nesta versão a pesquisadora apresentou as pendências indicadas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE foi atualizado

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências atendidas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1322478.pdf	11/07/2019 19:10:08		Aceito
Declaração de Instituição e	CRSM_CEP_3225220.pdf	11/07/2019 19:06:58	Marisa Passarelli	Aceito

**Endereço:** DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

**Bairro:** PACAEMBU

**CEP:** 01.246-903

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3893-4401

**E-mail:** cep.fm@usp.br

## ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

USP - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.491.261

Infraestrutura	CRSM_CEP_3225220.pdf	11/07/2019 19:06:58	Marisa Passarelli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MAMA_CORRIGIDO.pdf	11/07/2019 19:06:27	Marisa Passarelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTE_CORRIGIDO.pdf	11/07/2019 19:05:44	Marisa Passarelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CONTROLE_CORRIGIDO.pdf	11/07/2019 19:05:28	Marisa Passarelli	Aceito
Outros	emenda_Prod_glic.pdf	18/03/2019 17:08:24	Marisa Passarelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_pacientes.pdf	23/01/2019 13:19:45	Marisa Passarelli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_controle.pdf	23/01/2019 13:19:28	Marisa Passarelli	Aceito
Outros	resposta_parecer.pdf	21/01/2019 09:56:08	Marisa Passarelli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofinal.pdf	22/11/2018 13:38:20	Marisa Passarelli	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 07 de Agosto de 2019

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira  
(Coordenador(a))**



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
Centro de Referência da Saúde da Mulher

São Paulo, 05 de novembro 2018.

### CONSENTIMENTO DO DIRETOR PARA REALIZAÇÃO DE PESQUISA

A  
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA  
UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Prezados Senhores,

Informo, para os devidos fins, que o Setor de Mastologia do Hospital Pérola Byington será centro co-participante com o projeto de pesquisa intitulado: "**PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCULAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA – ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR, ESCORE DE RECORRÊNCIA E PROGNÓSTICO DA DOENÇA**", sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARISA PASSARELLI, como parte das teses de doutorado das alunas MARIA ISABELA B.A.CALDAS SAWADA e DANIELE CAZONI BALHAZAR, junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho (UNINOVE).

Atenciosamente,

  
Dr. JORGE Y. SHIDA  
CRM/SP 65.756  
Diretor - MASTOLOGIA

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

**DADOS DA PESQUISA**

**1. TÍTULO DA PESQUISA:**

**Produtos de glicação avançada e óxidos de colesterol na circulação de pacientes portadoras de câncer de mama - associação com a classificação molecular do tumor, escore de recorrência e prognóstico da doença.**

**2. PESQUISADOR PRINCIPAL: Dra. Marisa Passarelli**

**3. DEPARTAMENTO/INSTITUTO: UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

**1. Você está sendo convidada, como voluntária, a participar como grupo controle da pesquisa "PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCULAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA - ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR, ESCORE DE RECORRÊNCIA E PROGNÓSTICO DA DOENÇA"**

Vários fatores contribuem para o câncer de mama, como história familiar, tabagismo, obesidade, entre outros. Neste estudo, pretendemos avaliar no sangue a concentração de derivados do colesterol e componentes que geram inflamação, para analisar se estes compostos estão associados com o desenvolvimento e a evolução do câncer de mama em mulheres com diagnóstico recente desta doença. Os resultados do estudo permitirão compreender melhor a evolução do câncer nas mamas e possíveis formas para o melhor acompanhamento de mulheres com esta doença.

Para participar deste estudo, você deve atender aos seguintes critérios:

- Sexo feminino;
- Ter entre 18 (dezoito) e 70 (setenta) anos de idade;
- Nunca ter tido algum tipo de câncer;
- Não possuir diabetes mellitus, hipercolesterolemia, doença renal crônica, doenças autoimunes e imunossupressoras;
- Não fazer uso de estatinas;
- Não ser tabagista e/ou etilista
- Não fazer uso de terapia hormonal e/ou anticoncepcionais.

2. Caso concorde em participar do estudo, você deverá realizar uma única coleta de sangue (15 mL) por punção da veia do seu antebraço, após jejum de 8 horas. Serão determinados os lipídios, e marcadores de inflamação no sangue. A coleta de sangue será realizada pela equipe de enfermagem do Centro de Referência da Saúde da Mulher, em dia previamente agendado e não acarretará nenhum risco à sua saúde.

3. Os riscos e desconfortos da coleta de sangue, caso ocorram, serão baixos e podem incluir: dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa (hematoma), que desaparecerá em poucos dias.

4. Os estudos realizados a partir da sua amostra de sangue, serão comparados com amostras de mulheres na mesma faixa etária e com diagnóstico recente de câncer de mama. A partir de tal

comparação, será possível relacionar os parâmetros laboratoriais obtidos com a evolução clínica do câncer de mama.

5. Você não terá nenhum benefício direto por participar deste estudo. Os estudos realizados a partir de sua amostra de sangue, permitirão compreender como a presença do colesterol e componentes de inflamação estão relacionados com a evolução do câncer de mama, determinada de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais. No futuro, os resultados desta pesquisa poderão contribuir para melhorias no seguimento e tratamento de mulheres com câncer de mama.

6. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Marisa Passarelli, que pode ser encontrado na : Rua Vergueiro 235/249, Liberdade, São Paulo, telefone 11 2633 9000, e-mail: [m.passarelli@uni9.pro.br](mailto:m.passarelli@uni9.pro.br). No Centro de Referência da Saúde da Mulher você poderá procurar informações com a Dra. Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada, Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 683, 1º andar, telefones 11 3248 8085 e 11 98415-8684.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, Rua Vergueiro nº 235/249, 12º andar, Liberdade, São Paulo/SP, CEP 01504-001, telefone 11 3385-9010, e-mail [comitedeetica@uninove.br](mailto:comitedeetica@uninove.br), horário de funcionamento de 2ª a 6ª feira, das 11:30h às 13:00h e das 15:30h às 19:00h; Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM), Avenida Brigadeiro Luís Antônio, 683, Bela Vista, São Paulo/SP, CEP 01317-010, telefones 11 3248 8087 ou 11 3248 8080, e-mail [dircient@gmail.com](mailto:dircient@gmail.com); ou Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMU SP), Rua Doutor Arnaldo, 251, 21º andar, sala 36, Cerqueira Cesar, São Paulo/SP, CEP 01246-903, telefone 11 3893 4401/4407, e-mail [cep.fm@usp.br](mailto:cep.fm@usp.br).

7. Você tem o direito de acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas, assim como a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência e tratamento do câncer.

8. Seu direito de confidencialidade será garantido. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9. Não há despesas pessoais para a participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

10. As amostras obtidas serão armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Lípidos (LIM 10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, apenas durante o período de realização do estudo. Em caso de necessidade de utilização posterior das amostras será pedido novo consentimento após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

11. Você receberá uma via do termo deste termo de consentimento.

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCULAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA – ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR, ESCORE DE RECORRÊNCIA E PROGNÓSTICO DA DOENÇA". Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal                      Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha    Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo                              Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....  
E.MAIL:.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....  
NATUREZA (grau do parentesco, tutor, curador etc.) .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F   
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: ..... CIDADE: .....  
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....  
E.MAIL:.....

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

**DADOS DA PESQUISA**

**1. TÍTULO DA PESQUISA:**

Produtos de glicação avançada e óxidos de colesterol na circulação de pacientes portadoras de câncer de mama - associação com a classificação molecular do tumor, escore de recorrência e prognóstico da doença.

**2. PESQUISADOR PRINCIPAL: Dra. Marisa Passarelli**

**3. DEPARTAMENTO/INSTITUTO: UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO e CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER**

**1. Você está sendo convidada, como voluntária, a participar da pesquisa “PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCULAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA – ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR, ESCORE DE RECORRÊNCIA E PROGNÓSTICO DA DOENÇA”**

Vários fatores contribuem para o câncer de mama, como história familiar, tabagismo, obesidade, entre outros. Neste estudo, pretendemos avaliar, no seu sangue, a concentração de derivados do colesterol e componentes que geram inflamação para analisar se estes compostos estão associados com o desenvolvimento e evolução do câncer de mama que foi detectado em você. Os resultados do estudo permitirão compreender melhor a evolução do câncer nas mamas e possíveis formas para o melhor acompanhamento da doença.

Para participar deste estudo, você deve atender aos seguintes critérios:

- Sexo feminino;
- Ter entre 18 (dezoito) e 70 (setenta) anos de idade;
- Ter o diagnóstico recente de câncer de mama;
- Nunca ter tido nenhum outro tipo de câncer;
- Ainda não ter realizado nenhum tratamento para câncer;
- Ter o estadiamento prognóstico clínico entre I e II;
- Não possuir diabetes mellitus, hipercolesterolemia, doença renal crônica, doenças autoimunes e imunossupressoras;
- Não fazer uso de estatinas;
- Não ser tabagista e/ou etilista

2. Caso concorde em participar do estudo, você deverá realizar uma única coleta de sangue (15 mL) por punção da veia do seu antebraço, após jejum de 8 horas. Serão determinados os lipídios e colesterol no sangue. A coleta de sangue será realizada pela equipe de enfermagem do Centro de Referência da Saúde da Mulher, em dia previamente agendado e não acarretará nenhum risco à sua saúde.

3. Os riscos e desconfortos da coleta de sangue, caso ocorram, serão baixos e podem incluir: dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa (hematoma), que desaparecerá em poucos dias.

4. Deverá ser mantida a dieta e a medicação habitual, de acordo com recomendação médica, bem como o agendamento de todas as consultas, como usual.

5. Os estudos realizados a partir de sua amostra de sangue, permitirão compreender como a presença do colesterol e componentes de inflamação estão relacionados com a evolução do câncer de mama, determinada de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais. No futuro, os resultados desta pesquisa poderão beneficiar outras pacientes com câncer de mama, ajudando a melhorar as formas de seguimento e tratamento desta doença.

6. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Marisa Passarelli, que pode ser encontrado na : Rua Vergueiro 235/249, Liberdade, São Paulo, telefone 11 2633 9000, e-mail: [m.passarelli@uni9.pro.br](mailto:m.passarelli@uni9.pro.br). No Centro de Referência da Saúde da Mulher você poderá procurar informações com a Dra. Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada, Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 683, 1º andar, telefones 11 3248 8085 e 11 98415-8684.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, Rua Vergueiro nº 235/249, 12º andar, Liberdade, São Paulo/SP, CEP 01504-001, telefone 11 3385-9010, e-mail [comitedeetica@uninove.br](mailto:comitedeetica@uninove.br), horário de funcionamento de 2ª a 6ª feira, das 11:30h às 13:00h e das 15:30h às 19:00h; Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher (CRSM), Avenida Brigadeiro Luís Antônio, 683, Bela Vista, São Paulo/SP, CEP 01317-010, telefones 11 3248 8087 ou 11 3248 8080, e-mail [dircient@gmail.com](mailto:dircient@gmail.com); ou Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP), Rua Doutor Arnaldo, 251, 21º andar, sala 36, Cerqueira Cesar, São Paulo/SP, CEP 01246-903, telefone 11 3893 4401/4407, e-mail [cep.fm@usp.br](mailto:cep.fm@usp.br).

7. Você tem o direito de acesso a qualquer tempo às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas, assim como a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência e tratamento do câncer.

8. Seu direito de confidencialidade será garantido. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9. Toda assistência médica será realizada pela equipe do Centro de Referência da Saúde da Mulher.

10. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, pois a coleta de sangue será realizada no dia em que a Sra. vier para a realização de exames de rotina e consulta médica. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

11. As amostras obtidas serão armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Lípidos (LIM 10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo apenas durante o período de realização do estudo. Em caso de necessidade de utilização posterior das amostras será pedido novo consentimento após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

12. Você receberá uma via do termo deste termo de consentimento.

## UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NA CIRCULAÇÃO DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA – ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR, ESCORE DE RECORRÊNCIA E PROGNÓSTICO DA DOENÇA". Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

-----  
Assinatura do paciente/representante legal      Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha      Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo      Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1 NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD ( ..... )

E.MAIL: .....

2 RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....)

E.MAIL: .....

## ANEXO C – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "LIPOPROTEÍNAS DE DENSIDADE ALTA, PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA E ÓXIDOS DE COLESTEROL NO CÂNCER DE MAMA - ASSOCIAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR E O PROGNÓSTICO DA DOENÇA", protocolada sob o CEUA nº 7070120821 (ID 000271), sob a responsabilidade de **Marisa Passarelli** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Nove de Julho (CEUA/UNINOVE) na reunião de 21/09/2021.

We certify that the proposal "High-density lipoprotein, advanced glycation endproducts and oxysterols in breast cancer - association with the molecular classification of tumor and disease prognosis.", utilizing 30 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7070120821 (ID 000271), under the responsibility of **Marisa Passarelli** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Nove de Julho University (CEUA/UNINOVE) in the meeting of 09/21/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2021** a **08/2022**      Área: **Medicina**

Origem: **Biotério - Unidade Vergueiro**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 48 semanas**

N: **30**

Linhagem: **C57Bl/6**

Peso: **10 a 25 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Lipídes (LIM 10) da FMUSP, instituição em parceria com a UNINOVE para realização do estudo e sob a responsabilidade da Dra Marisa Passarelli. Imediatamente após a obtenção, as células serão cultivadas e, posteriormente, incubadas com material radioativo (14C-colesterol). A licença para uso de radioativos pela CNEN pertence ao Laboratório de Lipídes (LIM 10), tornando, portanto, necessário o cultivo das células naquele local

São Paulo, 27 de novembro de 2021

Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

Profa. Dra. Stella Regina Zamuner  
Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Nove de Julho

1  
2  
0