

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

Amarilis de Lima Campos

**AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA HDL
INDEPENDENTEMENTE DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA
DE HDL-COLESTEROL NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-
NEGATIVO**

São Paulo, SP

AMARILIS DE LIMA CAMPOS

**AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA HDL
INDEPENDENTEMENTE DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA
DE HDL-COLESTEROL NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-
NEGATIVO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo, SP

2022

Campos, Amarilis de Lima.

Aumento da atividade antioxidante da HDL independentemente da concentração plasmática de HDL-colesterol no câncer de mama triplo-negativo. / Amarilis de Lima Campos. 2022.
68 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho -
UNINOVE, São Paulo, 2022.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Marisa Passarelli.

1. HDL. 2. LDL. 3. Câncer de mama. 4. Câncer de mama triplo-negativo. 5. Oxidação.

I. Passarelli, Marisa. II. Título

CDU 616

São Paulo, 15 de dezembro de 2022.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **AMARILIS DE LIMA CAMPOS**

Título da dissertação: **AUMENTO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA HDL INDEPENDENTEMENTE DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HDL-COLESTEROL NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO.**

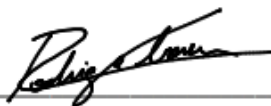
Presidente: PROFA. DRA. MARISA PASSARELLI



Membro: PROFA. DRA. MÁRCIA SILVA QUEIROZ



Membro: PROF. DR. RODRIGO TALLADA IBORRA



A Deus, Nosso Senhor Jesus Cristo, Nossa Senhora, meu Anjo da Guarda e Santos pelas bênçãos concedidas sem limites e sem fim.

Aos meus pais, Odilia e Vivaldo, avós Ana, Antônio e Isabel, meu tio José (*in memoriam*), que me educaram no caminho do amor, honestidade e responsabilidade.

A todos os seres de luz que já cruzaram meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado somente foi possível após a colaboração de diversos profissionais, colegas e amigos que contribuíram ao longo de todo o processo, no qual destaco:

- À Professora Doutora Marisa Passarelli, minha orientadora, por sua paciência, inteligência, clareza, atenção, empenho e sentido prático com que sempre me orientou, por todas as explicações e correções, sempre procurando me motivar, seu exemplo de profissionalismo servirá para a vida. Obrigada por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Professora, você foi e está sendo muito mais que orientadora: para mim será sempre minha mestra e amiga.

- À Universidade Nove de Julho – Programa de Pós- Graduação em Medicina – Ciências da Saúde.

- Aos professores e funcionários da UNINOVE, por todo apoio e conhecimentos transmitidos ao longo desta jornada.

- Aos amigos e família Benjamin Bento Alves, Toni Lima Alves, Fabiana Lima, Isabella Lima, Mariana Macedo, Doris Macedo, Ahmed Adalhi, João Paulo Leote, Priscila Florenzano Goncalves, Leonardo Lavans, Andreia Valentim, Luiz Gustavo Valentim, Gabryela Resende, Caio Resende, Alvelina, Tania Boueri e Glauber Soares, Dra. Marileia Ferreira, que mesmo longe ou perto sempre acreditaram no meu potencial e na conclusão desse mestrado.

- Aos meus alunos e também amigos por todo o suporte, apoio, cancelar de aulas, incentivo e orações: Adriana Peretti Moreno, Andrea Loise Nero, Cleusa Buzato, Eliane, Daniela Barriola, Daniela Oliveira, José Edmilson Moreno, Julia Moreno, Julia Funicello, Fernanda Sacoletto, Emily Guimarães, Eugenor

Serrador, Celso Italo Ramos, Gabriela, Giulia Moreira, Fabio Ferrer, Laura Fernandes, Lidia Maria, Marcos Eduardo Lima, Marina, Sonia Carpi, Vera Pavão, Terezinha Barban, Luciane Perez Rosa, Nohran Soares, Manuela Perestrelo, Patricia Moreira, Priscila Maria Marcos, Regina Cairo, Roseli Domingues, Rose Laterza, Andrea Loise Nero, sem dúvida sem o apoio e compreensão de vocês, isso tudo não teria sido possível.

- Aos colegas de pós-graduação, Dra. Maria Isabela Sawada (pela seleção das participantes), Dra. Mozânia Reis, Jacira Xavier de Carvalho, Antonio do Nascimento, Sayanne Montenegro, Lucas Alves, Eduarda Palanca pela parceria e cooperação nas aulas.

- À equipe do Laboratório de Lípidos (LIM10) da Faculdade de Medicina da USP, por todo o aprendizado, acolhimento, colaboração e experiências trocadas durante este período. Em especial, Monique Mello (pelo isolamento da HDL), Sayonara Assis, Valéria Nunes (sua paciência comigo será algo de que sempre me lembrarei), Kelly Gomes, Daniela Ribeiro e Leonardo Szalo, Rosibel da Silva e à Claudia Souza, pelo apoio administrativos e palavras de apoio.

- À Profa. Dra. Edna Nakandakare, por seu apoio e amizade.

- Ao Prof. Dr. Rodrigo Tallada Iborra, pela amizade e por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses anos.

- À todas as voluntárias que participaram do estudo e por isso contribuíram para novas perspectivas a respeito do câncer de mama: minha profunda gratidão e desejo de cura para todas as pacientes do câncer de mama.

- Faculdade Medicina da Universidade de São Paulo.

- Unidade Básica de Saúde Dra. Ilza Weltman Hutzler pela seleção do grupo controle.

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (projeto regular de pesquisa # 2019/18431-4).

*“A mudança não virá se esperarmos por outra
pessoa em outra hora. Nós somos aqueles
pelos quais esperamos. Nós somos a mudança
que procuramos.”*

Barack Obama

RESUMO

Campos AL. Aumento da atividade antioxidante da HDL independentemente da concentração plasmática de HDL-colesterol no câncer de mama triplo-negativo.

A associação entre a concentração de colesterol na lipoproteína de densidade alta (HDLc) com o câncer de mama é controversa. Avaliou-se a atividade antioxidante da HDL no câncer de mama triplo-negativo em comparação a controles. Foram incluídas 27 mulheres, com diagnóstico recente de câncer de mama triplo-negativo, virgens de tratamento e 27 mulheres saudáveis (grupo controle), pareadas por idade e índice de massa corporal. HDL e lipoproteína densidade baixa (LDL) foram isoladas do plasma por ultracentrifugação. O perfil de lípides no plasma e na HDL foi determinado por métodos enzimáticos, e apolipoproteína A-I (apo A-I) e apoB, por imunoturbidimetria. Determinou-se tempo de retardo da oxidação e razão máxima de formação de dienos conjugados em LDL incubada, in vitro, com sulfato de cobre e HDL de ambos os grupos. O grupo controle foi semelhante ao câncer de mama quanto as concentrações e razões de lípides no plasma e composição da partícula de HDL. A capacidade da HDL em retardar a oxidação da LDL foi 22 % maior no grupo câncer de mama e se correlacionou positivamente com o conteúdo de apoA-I na HDL, sendo maior nos estágios avançados do câncer de mama (estágios III e IV). A razão máxima de formação de dienos conjugados foi semelhante entre os grupos e entre os estágios clínicos da doença. Os resultados destacam o papel da HDL como defesa antioxidante, independentemente da concentração de HDLc, contribuindo para limitar o estresse oxidativo em estágios avançados de tumores de mama triplo-negativo.

Palavras-chave: HDL, LDL, câncer de mama, câncer de mama triplo-negativo, oxidação.

ABSTRACT

Campos AL. Increased antioxidant activity of HDL independently of plasma HDL-cholesterol concentration in triple-negative breast cancer.

The association between high-density lipoprotein (HDLc) cholesterol concentration and breast cancer is controversial. We evaluated the antioxidant activity of HDL in triple-negative breast cancer compared to controls. We included 27 women with a recent diagnosis of triple-negative breast cancer, naïve to treatment, and 27 healthy women (control group), matched for age and body mass index. HDL and low-density lipoprotein (LDL) were isolated from plasma by ultracentrifugation. The profile of lipids in plasma and HDL was determined by enzymatic methods, and apolipoprotein A-I (apo A-I) and apoB by immunoturbidimetry. The lag time phase and the maximum ratio of conjugated dienes formation in LDL incubated, in vitro, with copper sulfate and HDL from both groups were determined. The control group was similar to breast cancer regarding plasma lipid concentrations and ratios and HDL particle composition. The ability of HDL to delay LDL oxidation was 22% greater in the breast cancer group and was positively correlated with the apoA-I content of HDL, being greater in advanced stages of breast cancer (stages III and IV). The maximum rate of conjugated dienes formation was similar between groups and clinical stages of the disease. The results highlight the role of HDL as an antioxidant defense, regardless of HDLc concentration, helping to limit oxidative stress in advanced stages of triple-negative breast tumors.

Keywords: HDL, LDL, breast cancer, triple negative breast cancer, oxidation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura geral da lipoproteína de densidade alta (HDL)	16
Figura 2 – Formação da lipoproteína de densidade alta (HDL)	18
Figura 3 – Contribuição da LDL e LDL oxidada para o <i>pool</i> de colesterol em células cancerosas	23
Figura 4 – Ação da HDL na modulação do conteúdo de colesterol em células tumorais	24
Figura 5 – Classificação molecular do câncer de mama	27
Figura 6 – Tempo de retardo da oxidação da LDL na presença de HDL isolada do grupo controle e câncer de mama triplo-negativo	38
Figura 7 – Razão máxima de formação de dienos conjugados em LDL incubada na presença de HDL do grupo controle e câncer de mama triplo-negativo	39
Figura 8 – Correlação entre apoA-I na HDL do grupo câncer de mama e atividade antioxidante.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idade, IMC e perfil menopáusico nos grupos controle e câncer de mama triplo-negativo	33
Tabela 2 – Perfil de lípides plasmáticos nos grupos controle e câncer de mama triplo-negativo	34
Tabela 3 – Idade e IMC em mulheres com câncer de mama triplo-negativo de acordo com o estágio clínico da doença.	35
Tabela 4 – Perfil de lípides plasmáticos em mulheres com câncer de mama triplo-negativo de acordo com o estágio clínico da doença.	36
Tabela 5 – Composição em lípides e apo A-I da HDL nos grupos controle e câncer de mama triplo-negativo	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador cassete de ligação ao trifosfato de adenosina, subfamília ABCA, membro 1
Apo-AI	Apolipoproteína AI
Apo-AIV	Apolipoproteína AIV
Apo-AV	Apolipoproteína AV
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE	Apolipoproteína E
CT	Colesterol Total
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
FL	Fosfolípides
FLA2	Fosfolipase A2
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HDLc	Colesterol na lipoproteína de densidade alta
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDLc	Colesterol na lipoproteína de densidade baixa
SAA	Proteína amiloide A sérica
OC	Óxidos de colesterol
TG	Triglicérides
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

VLDLc

Colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1. Contextualização	15
1.1 Lipoproteína de alta densidade (HDL): Formação, estrutura e Metabolismo	15
1.2 HDL e transporte reverso de colesterol	18
1.3 HDL e doenças crônicas não transmissíveis	19
1.4 HDL e câncer de mama	20
1.5 HDL, estresse oxidativo e câncer de mama	21
1.6 Câncer de mama	24
2. Justificativa	28
3. Objetivo	29
4. Métodos	30
4.1 Casuística	30
4.2 Obtenção de amostras de plasma e dosagens bioquímicas	30
4.3 Isolamento da HDL	31
4.4 Efeito inibitório da HDL sobre a oxidação da LDL “in vitro”	31
5. Análise estatística	32
6. Resultados	33
7. Discussão	41
8. Considerações Finais	46
9. Referências	47
ANEXO A - Aprovações dos Comitês de Ética	52
ANEXO B – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	63

1. Contextualização

1.1 Lipoproteína de alta densidade (HDL): Formação, estrutura e Metabolismo

A lipoproteína de densidade alta (HDL) promove o transporte de lípidos na circulação sanguínea e linfática. Ela é inversamente associada ao risco cardiovascular e desempenha importante papel em outras doenças, devido às suas funções na remoção do excesso de colesterol celular, atuação como antioxidante, anti-inflamatória, vasodilatadora, hematopoiética e na melhora da homeostase glicêmica.

A HDL compreende uma gama de partículas heterogêneas em tamanho, composição e funcionalidade que se distribuem entre as faixas de densidade de 1,063 e 1,21 g/mL e tamanho entre 7,6 a 10,6 nm de diâmetro¹. Apresentam um núcleo lipídico hidrofóbico, composto por pequena quantidade de colesterol esterificado (CE) e triglicérides (TG; ~5%)². Ao redor do núcleo existe uma camada monofásica de fosfolípidos (FL; ~15%), colesterol não-esterificado ou livre (CL; juntamente com CE compõe 20% da partícula) e apolipoproteínas (apo; ~50%). Estas proteínas, representadas, principalmente, pela apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoE, apoC e apoM são responsáveis pela estabilização da estrutura da lipoproteína e exercem diversas funções no metabolismo lipídico. A apoA-I está em maior quantidade na HDL, sendo cofator para a atividade da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e responsável pela remoção de colesterol celular e propriedades antioxidante e anti-inflamatória da HDL. A apoA-II é responsável pela atividade da LCAT, da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e lipase hepática (LH), além de favorecer a ação antioxidante³.

Outras apolipoproteínas em menor quantidade também podem estar presentes na HDL, como a apoA-IV (estimula LCAT, modula a atividade da lipoproteína lipase, LPL e estimula do efluxo de colesterol); apoA-V (tem um efeito importante no metabolismo de TG), apoC-I (inibição da captação mediada por receptor de lipoproteínas ricas em triglicerídeos), apoC-II (ativa a LPL), apoC-III (ativa a LPL), apoD (lipocalina) e apoE (transporte e metabolismo de

lipídios)³. A análise do proteoma da HDL revela a presença de muitas proteínas associadas à sua estrutura e não diretamente ligadas ao metabolismo lipídico. Entretanto, essas proteínas parecem contribuir para a remodelagem da lesão aterosclerótica e sua distribuição parece variar de acordo com diversas condições metabólicas, podendo ser utilizada como possível marcador clínico e terapêutico⁴ (Figura 1).

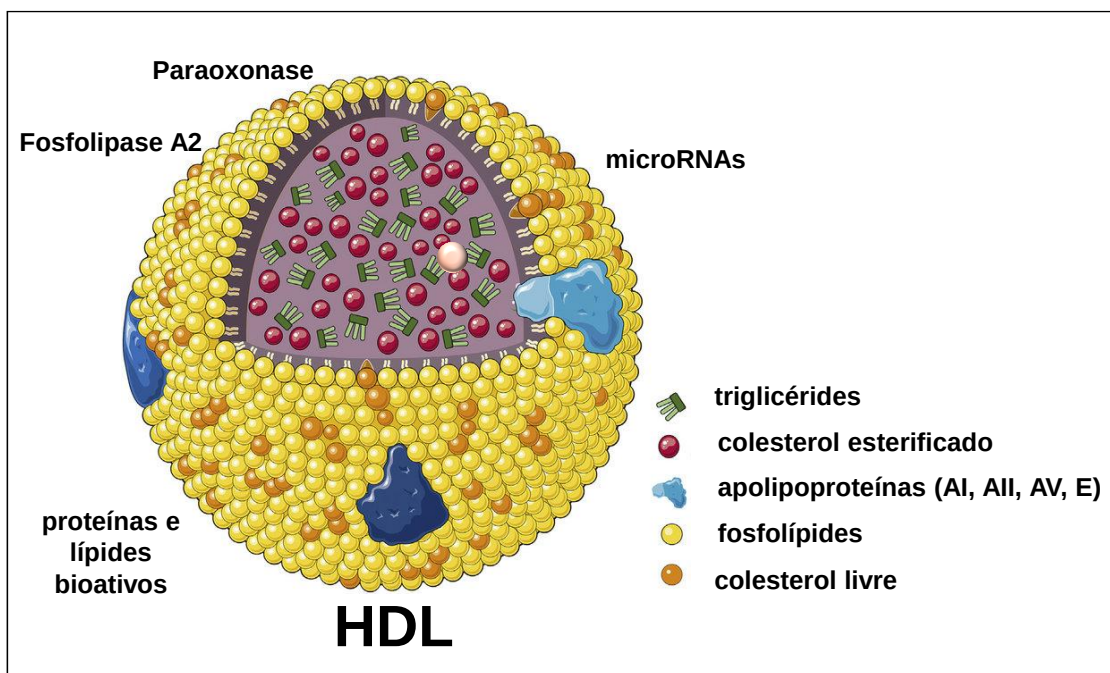


Figura 1. Estrutura geral da lipoproteína de densidade alta (HDL). A HDL é composta apresenta-se numa faixa de 7,6 a 10,6 nm de diâmetro, distribuindo-se na faixa de densidade entre 1,063 e 1,21 g/mL. A HDL é formada por um núcleo contendo colesterol esterificado e pequena quantidade de triglicérides, e uma superfície hidrofílica rica em fosfolípides, e apolipoproteínas (principalmente apo A-I, apo A-II, apo A-IV, apoV, apo C-II, apoD e apo E). Além, disso, transporta enzimas antioxidantes (paraoxonase, fosfolipase A2), microRNA, proteínas e lípides bioativos.

Enzimas antioxidantes encontram-se ligadas à HDL e incluem a paraoxonase 1 (PON-1) e a fosfolipase A-2 (FLA-2). A PON-1 é uma potente enzima antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica⁴. Em associação à apoA-I, ela é capaz de metabolizar FL oxidados na LDL e sequestrar peróxidos lipídicos, minimizando a modificação oxidativa das LDL, o insulto endotelial e a aterogênese⁵. A apoA-1, a principal proteína estrutural da HDL, é necessária para ativar a PON1 e, portanto, o bom funcionamento de ambas as moléculas é

essencial para os efeitos antioxidantes e protetores da HDL⁶.

A FLA-2 ou fator ativador plaquetário acetil-hidrolase pode se encontrar associada às lipoproteínas, LDL e HDL, e sua expressão é regulada por mediadores inflamatórios³. Nos estados inflamatórios agudos, a FLA-2 está associada principalmente à HDL, contribuindo para a hidrólise de FL associados a lipoproteínas⁵. A inflamação e, especialmente, as condições de fase aguda podem influenciar significativamente o metabolismo da HDL e, portanto, sua composição proteica e lipídica. Uma das características da fase aguda da HDL é o alto teor de lisofosfatidilcolinas, gerado por um grande aumento na atividade da FLA-2. Em pacientes com sepse, a FLA-2 plasmática foi quase completamente associada à HDL, que é a principal fonte de fosfolípidos plasmáticos. Em estudos usando um modelo de camundongo superexpressando FLA-2 humana, as concentrações de HDL foram acentuadamente reduzidas, o que foi acompanhado por uma redução no tamanho das partículas de HDL, sugerindo que a HDL é um substrato importante para a FLA-2. Além disso, a FLA-2 recombinante demonstrou ser mais ativa em HDL isolada do que em outras lipoproteínas, como LDL⁴.

A HDL muda em tamanho, densidade e composição química devido às suas taxas de síntese, catabolismo e remodelação intravascular contínua pela atividade de enzimas e proteínas de transporte⁷.

A formação da HDL começa no fígado e no intestino³ com a síntese da apo-AI e sua secreção com pequenas quantidades de lípidos (CL e FL), o que contempla a geração da pré beta HDL ou HDL nascente. Apo A-I dissociada e pré- beta interagem com o transportador ABCA-1 removendo colesterol celular, à custa de hidrólise de ATP⁸. Além disso, a maior fonte de HDL origina-se na circulação, a partir da hidrólise de TG de quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), pela lipoproteína lipase. Com a redução do tamanho destas lipoproteínas ricas em TG ocorre o desprendimento de componentes de suas superfícies originando as pré-beta HDL. À medida em que se enriquece em colesterol e TG, a HDL aumenta de tamanho, tornando-se uma partícula esférica madura⁵. (Figura 2).

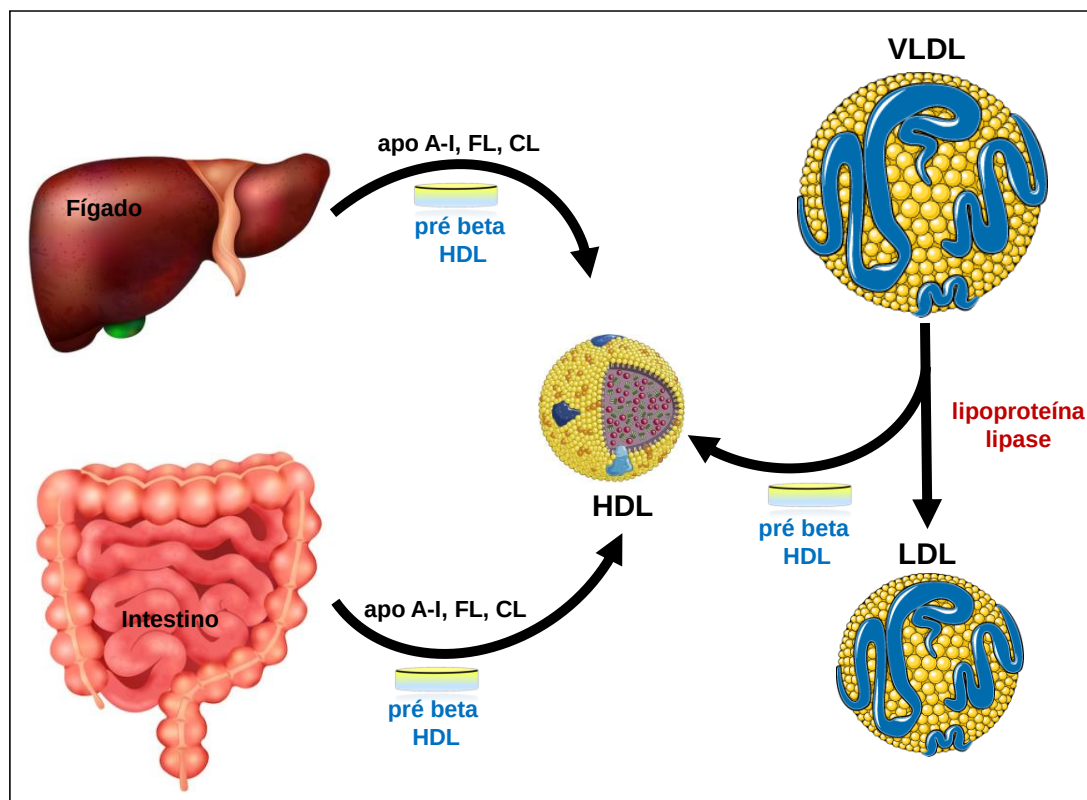


Figura 2. Formação da lipoproteína de densidade alta (HDL). A HDL é formada a partir da síntese de apoA-I no fígado e intestino e exportação de colesterol livre (CL) e fosfolípides (FL) na forma de pré- beta HDL. Além disso, grande parte de sua formação vincula-se à metabolização de triglicérides das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons pela lipoproteína lipase na circulação sanguínea, com desprendimento de componentes e superfície que geram pré- beta HDL. Estas partículas nascentes dão origem à HDL madura esférica.

1.2 HDL e transporte reverso de colesterol

Uma das principais funções da HDL é a retirada do excesso de colesterol da periferia e sua condução ao fígado, o que permite sua eliminação na bile e excreção fecal, por meio do chamado transporte reverso de colesterol (TRC)³.

O transporte de colesterol dos tecidos periféricos para a HDL e desta para o fígado é uma via importante para a homeostase do colesterol no corpo humano⁵. O TRC inicia-se com a retirada do excesso de colesterol das células periféricas, graças à interação da apoA-I dissociada ou partículas nascentes de HDL (pré beta HDL) com o transportador ABCA-1⁴. Na partícula de HDL, o CL é esterificado, graças à ação da LCAT. Devido à sua baixa solubilidade no meio

aquoso, o CE passa a ocupar o núcleo da HDL⁶, o que contribui, gradativamente, para o aumento do tamanho da HDL (HDL₃ e HDL₂). Partículas maiores de HDL, como as HDL₂, também removem colesterol celular, por intermédio do transportador ABCG-1. Parte do CE da HDL é transferido para VLDL, LDL ou quilomícrons pela ação da CETP e estas lipoproteína captadas pelo fígado, por meio dos receptores B-E ou E. Em troca, a CETP transfere TG para as HDL e esta formação de HDL enriquecida em TG a torna mais sensível à modificação lipolítica pela lipase hepática (LH) e lipase endotelial, resultando na formação de partículas menores de HDL que são catabolizadas mais rapidamente. A apoA-I, dissocia-se e é catabolizada pelos rins⁹.

Outra parte do CE do núcleo da HDL, é diretamente removida pelo receptor *scavenger* classe B, tipo 1 (SR-B1) no fígado e tecidos esteroideogênicos (suprarrenal e gônadas)¹⁰. O fluxo de colesterol ao longo do transporte reverso caracteriza-se pelo crescimento gradual da partícula de HDL em tamanho, devido ao seu enriquecimento em CE e TG. Após o descarte de CE no fígado, a HDL retorna ao formato discoidal de pré-beta HDL reiniciando a retirada de colesterol livre das células periféricas.

1.3 HDL e doenças crônicas não transmissíveis

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são a principal causa de morte no mundo, sendo as doenças cardiovasculares a primeira causa de morte. O câncer ocupa a segunda ou terceira posição, responsável por mortes prematuras, perda de qualidade de vida, além de impactos econômicos e sociais adversos. As doenças não transmissíveis são responsáveis por aproximadamente 70% das mortes globais, respondendo por mais de 38 milhões de mortes anualmente, superando em muito as mortes por causas externas e doenças infecciosas. Aproximadamente 45% das mortes por DCNT em todo o mundo, das quais mais de 17 milhões de pessoas, são causadas por doença coronariana¹¹. Distribuição semelhante é notada no Brasil, onde 72% dos óbitos são por doenças não transmissíveis, sendo 30% por doenças cardiovasculares e 16% por câncer. Em resposta ao combate às DCNT, o Ministério da Saúde do Brasil introduziu importantes políticas de combate a essas doenças, em especial a organização para a

a Vigilância de Doenças Não Transmissíveis, que visa compreender a extensão, distribuição, tendência, assim como os agravos e fatores de risco das doenças crônicas não transmissíveis. A Política Nacional de Promoção da saúde tem favorecido diversas ações na área de nutrição saudável, atividade física, prevenção ao tabagismo e alcoolismo, sendo também prioridade do governo¹².

A HDL é, classicamente, implicada com a doença macrovascular aterosclerótica. A doença cardiovascular é a principal causa de morte no Brasil e no mundo¹³ e se manifesta, principalmente, pelo infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico¹⁴. Fatores de risco clássicos incluem as dislipidemias (elevação de colesterol total e triglicerídeos e redução de HDLc), hipertensão arterial, diabetes mellitus, tabagismo, sexo masculino, idade e histórico familiar. Além disso, componentes do meio, incluindo sedentarismo, etilismo e componentes da dieta podem modular a evolução da doença cardiovascular.

Altas concentrações plasmáticas de HDLc têm sido associadas à maior ateroproteção devido às muitas ações da HDL descritas acima. No entanto, o estudo de doenças genéticas que afetam as concentrações de HDLc mostra contradições. Além disso, a utilização de medicamentos que elevam o HDLc nem sempre se traduzem em benefício sobre desfechos cardiovasculares¹⁵. Neste sentido, considera-se que a simples determinação da concentração plasmática de HDLc ou apo A-I possa não ser a melhor métrica para a proteção conferida pela HDL. A determinação da funcionalidade da HDL seria um bom indicador, entretanto, esbarrando na falta de ensaios clínicos padronizados e na grande quantidade de funções desempenhadas pelas HDL. Este conceito parece aplicar-se a outras doenças para as quais a HDL exerce proteção, como o câncer.

1.4 Câncer de mama e HDL

Ao longo dos anos, surgiram evidências de que o metabolismo do colesterol está ligado ao desenvolvimento de câncer. Por exemplo, concentrações elevadas de colesterol estão associadas a uma maior incidência de câncer, e os medicamentos que reduzem a colesterolemia, como as estatinas,

mostram efeitos benéficos ao reduzir o risco e a taxa de mortalidade de vários tipos de câncer, como o câncer de mama, próstata e colón⁵. De outro lado, concentrações elevadas de HDL, na maioria dos estudos, vinculam-se ao menor desenvolvimento de câncer, particularmente o câncer de mama¹⁶.

Vários ensaios clínicos demonstraram que alterações metabólicas associadas à obesidade podem estar associadas a um risco aumentado de câncer de mama^{16,17}. Estudos clínicos examinando a relação entre LDLc, HDLc e câncer de mama resultaram em achados conflitantes. No entanto, enquanto os resultados de grandes estudos parecem indicar uma associação positiva entre o LDLc e o câncer de mama, o HDLc parece favorecer uma associação negativa com a doença¹⁷. Semelhantemente, concentrações reduzidas de apo A-I na circulação parecem predizer desfechos clínicos negativos em pacientes com câncer de mama⁴.

Conforme comentado acima, vários estudos demonstram que o HDLc não reflete com precisão as funções fisiológicas da HDL e isto também parece ser aplicado às associações ainda contraditórias entre HDLc e câncer de mama. Diferentes resultados têm sido relatados sobre a relação entre risco de câncer de mama e HDLc, uma atenção crescente tem sido focada no papel da HDL e nos mecanismos moleculares do desenvolvimento do câncer de mama¹⁸.

A capacidade da HDL em remover colesterol de células tumorais e de macrófagos infiltrados no microambiente tumoral é limitante à proliferação celular e metástase. O colesterol é substrato fundamental ao processo de divisão celular¹⁸ e a capacidade de seus derivados (óxidos de colesterol) em ativarem o receptor X hepático (LXR) vincula-se à transição epitélio-mesenquimal e ao potencial metastático no câncer de mama. Neste sentido, o transporte reverso de colesterol mediado pela HDL pode conferir proteção contra o desenvolvimento e a evolução do câncer de mama¹⁹.

1.5 HDL, estresse oxidativo e câncer de mama

Concentrações plasmáticas mais elevadas de marcadores de peroxidação lipídica e alterações nas atividades de enzimas que desempenham um papel fundamental nas propriedades da HDL têm sido descritas em pacientes com câncer de mama²⁰. O funcionamento da HDL é atrelado à sua composição

em apolipoproteínas e enzimas. A atividade de LCAT mais baixa indica alterações no metabolismo do colesterol. Além disso, as menores atividades de enzimas envolvidas nas propriedades antioxidantes da HDL, como PON1 e FLA2, sugerem que esse papel fundamental da HDL pode estar prejudicado em pacientes com câncer de mama²¹. De outro lado, o aumento da atividade plasmática da FLA2 associada a LDL em pacientes com câncer de mama pode contribuir para a produção de lípidos bioativos potentes, como lisofosfolípidos e ácidos graxos oxidados e, em última instância, para o prejuízo na função da HDL²².

O insulto inflamatório que acompanha os tumores também pode acarretar aumento de estresse oxidativo e prejuízo às funções da HDL²³. A menor proteção contra a oxidação de LDL vincula-se ao maior suprimento de colesterol a macrófagos por meio da captação destas lipoproteínas modificadas por receptores *scavenger*³. Consequentemente, aumenta o suprimento de lípidos para o microambiente tumoral, criando-se um círculo vicioso que culmina na exacerbação de estresse oxidativo e inflamatório. O estresse oxidativo, por sua vez, promove danos ao DNA em cânceres, o que resulta em transformação maligna e carcinogênese, além de alterações epigenéticas que modificam a expressão de proteínas celulares²⁴.

Maior concentração de LDL oxidada foi detectada em câncer de mama, câncer gástrico e câncer de cólon²⁰. Acredita-se que a LDL nativa e a LDL oxidada possam desempenhar papéis aditivos nas células cancerosas favorecendo o suporte de colesterol necessário à tumorigênese, proliferação, angiogênese, invasão e metástase (Figura 3)¹⁸.

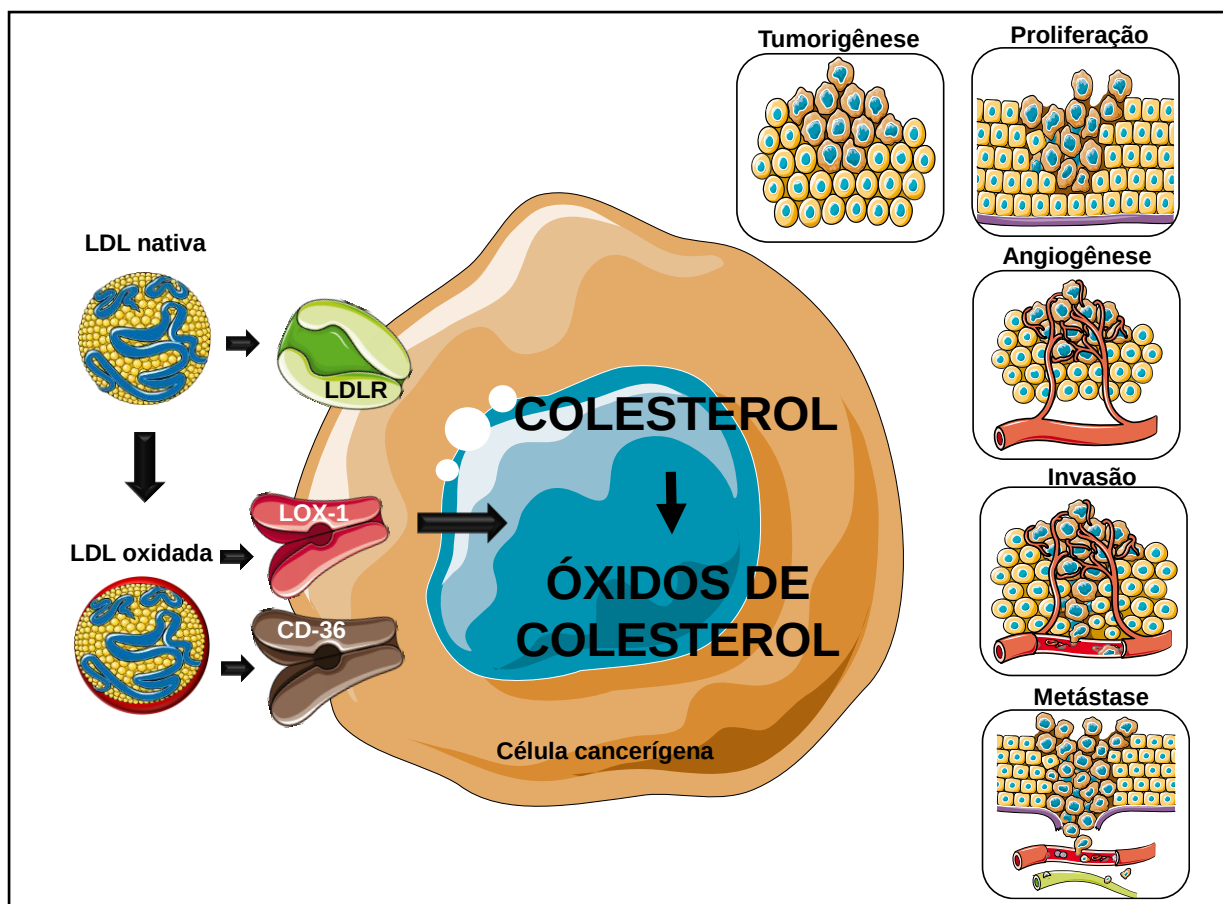


Figura 3. Contribuição da LDL e LDL oxidada para o *pool* de colesterol em células cancerosas. A LDL nativa ou quimicamente modificada por oxidação podem ser captadas, respectivamente, pelos receptores de LDL (LDLR) ou receptores *scavenger* (LOX-1 e CD36), contribuindo para o acúmulo de colesterol que favorece a tumorigênese, proliferação de células cancerígenas, angiogênese, invasão e metástase (adaptado¹⁸).

Conforme comentado anteriormente, a HDL protege a LDL contra a oxidação, limitando, portanto, a captação destas lipoproteínas pelas células, o acúmulo de colesterol e estresse oxidativo intracelular (Figura 4).

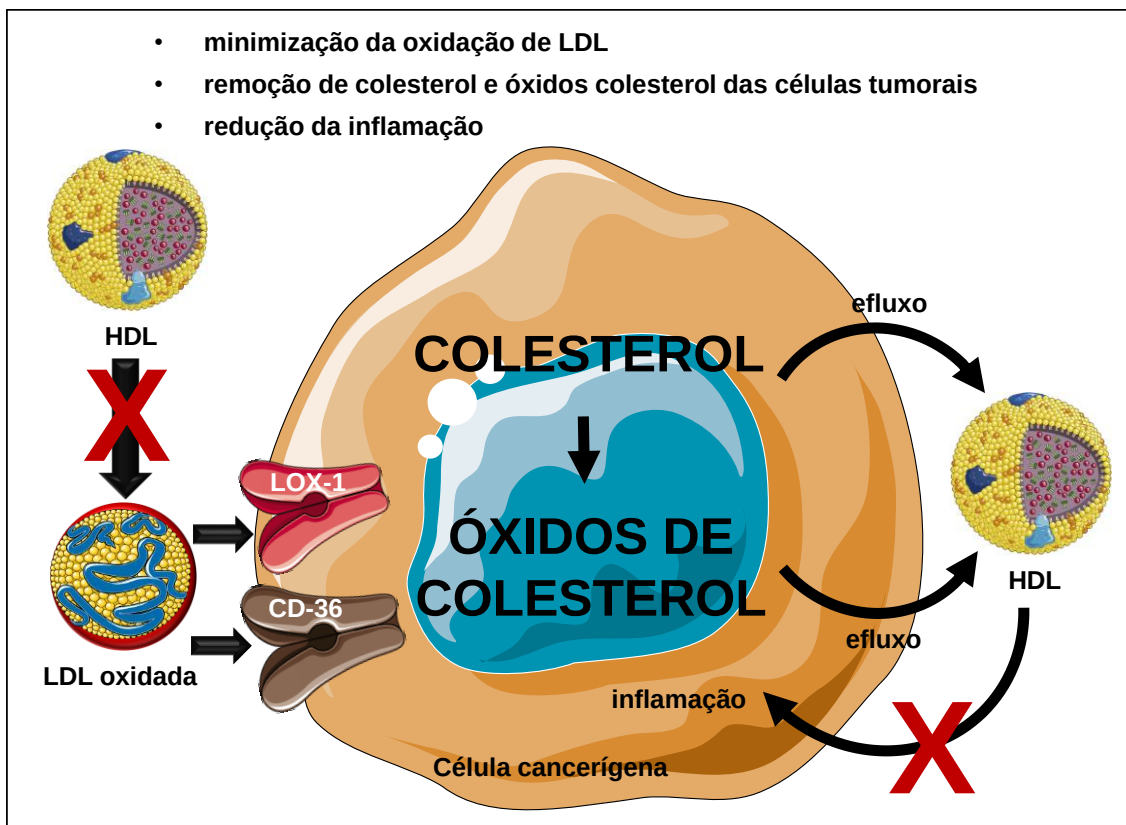


Figura 4. Ação da HDL na modulação do conteúdo de colesterol em células tumorais. A HDL minimiza a oxidação de LDL e consequentemente o aporte de LDLc à célula tumoral. Paralelamente, promove a remoção do excesso de colesterol e óxidos de colesterol e limita o processo inflamatório.

1.6 Câncer de mama

No século XX, houve grandes mudanças no entendimento e manejo do câncer, uma doença heterogênea, muitas vezes incurável, que é uma das principais causas de morte na população mundial.

Vários processos têm contribuído para essas mudanças, incluindo o avanço no conhecimento médico, novas tecnologias diagnósticas e terapêuticas²⁵. Particularmente, a inclusão dos exames de imagem possibilitou o melhor rastreamento e a identificação de alterações mamárias precoces¹².

Dentre os cânceres, o de mama é mais comum em mulheres brasileiras (exceto para câncer de pele não melanoma). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer²⁶, estima-se que haverá 66.280 novos casos de câncer de mama a cada ano de 2020 a 2022. Esse valor corresponde ao risco

esperado de 61,61 novos casos por 100.000 mulheres. As taxas de sobrevivência ao câncer de mama variam amplamente em todo o mundo. Estima-se uma taxa de sobrevivência em 5 anos de 80 % nos países desenvolvidos e menos de 40 % nos países em desenvolvimento¹.

Fatores de risco clássicos para o câncer de mama incluem: sexo feminino, idade superior a 50 anos, menarca antes dos 12 anos de idade, primeira gestação após os 30 anos de idade, menopausa tardia (após os 55 anos de idade), nuliparidade ou prole reduzida, amamentação ausente ou em curto período. Antecedentes pessoais, como hiperplasias atípicas e câncer de mama, e histórico familiar (Câncer de ovário, mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e genes não-*BRCA*) também contribuem para o risco de câncer de mama. Fatores de risco modificáveis agregam obesidade, dislipidemia, etilismo e sedentarismo²⁷.

Clinicamente, o câncer de mama pode ser caracterizado em vários estágios, de acordo com o tamanho, tipo de neoplasia e estágio em que as células tumorais se infiltraram no tecido mamário²³. O estágio 0, refere-se ao tumor não invasivo, com células cancerosas confinada a mama¹⁷. No estágio 1, o carcinoma torna-se invasivo e a invasão microscópica é possível de ser detectada neste estágio. É dividido em 2 tipos: Estágio 1A e Estágio 1B. O grau 1A descreve o tumor de até 2 cm de tamanho sem comprometimento de linfonodos; enquanto o estágio 1B inclui um pequeno grupo de células cancerígenas maiores que 0,2 mm localizadas em linfonodo²⁵. O estágio 2 também é subdividido em 2A e 2B. O estágio 2A caracteriza que a neoplasia é encontrada nos linfonodos axilares ou sentinela, mas nenhuma neoplasia é encontrada na mama. O tumor pode ser menor ou maior que 2 cm, mas não maior que 5 cm. Contudo, o estágio 2B descreve que o tumor pode ser maior que 5 cm, mas não atinge os linfonodos axilares¹⁶. O estágio 3 é dividido em três subcategorias: 3A, 3B e 3C. No estágio 3A, nenhum tumor é encontrado na mama, mas pode ser encontrado em 4 a 9 linfonodos axilares ou sentinela, enquanto que o estágio 3B descreve um tumor de qualquer tamanho, mas que tenha causado inchaço ou úlcera na pele da mama e pode ter se disperso até 9 linfonodos axilares ou sentinela. Esse estágio inclui pele vermelha, quente e inchaço da mama. Já o estágio 3C, descreve uma neoplasia que se espalhou para 10 ou mais linfonodos axilares e também envolve linfonodos acima e abaixo

da clavícula⁵. O estágio 4 é o estágio invasivo e metastático, com disseminação para outros órgãos, como pulmões, ossos, fígado, cérebro, entre outros¹⁷.

Do ponto de vista molecular, o câncer de mama é caracterizado de acordo com a expressão de receptor de estrogênio, progesterona e proteína HER-2. Esta classificação confere a possibilidade de melhor rastreio, seguimento clínico, terapêutico e prognóstico. Tumores luminais A e B são positivos para receptor de estrogênio e progesterona e correspondem a 70 % dos casos. O tipo HER-2 expressa o gene *ERBB2* (que codifica para a proteína conhecida como família do fator de crescimento epidérmico), manifestando-se em cerca de 18-20% dos cânceres de mama invasivos. O câncer de mama triplo-negativo é caracterizado por ausência de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2²⁰.

Estudos epidemiológicos demonstram que o triplo-negativo ocorre principalmente em mulheres jovens na pré-menopausa com idade inferior a 40 anos e é responsável por aproximadamente 15-20 % de todos os pacientes com câncer de mama²². Em comparação com outros subtipos de câncer de mama, as pacientes com tumores triplo-negativos apresentam menor sobrevida e uma taxa de mortalidade de 40 % nos primeiros 5 anos após o diagnóstico²⁸. O triplo-negativo é muito agressivo e cerca de 46 % dos pacientes apresentam metástases à distância. O tempo médio de sobrevida após a metástase é de apenas 13,3 meses e a taxa de recorrência após a cirurgia chega a 25 %. A metástase, geralmente, envolve o cérebro e os órgãos viscerais, ocorrendo, em geral, após o terceiro ano de diagnóstico. Os tumores triplo-negativos, frequentemente apresentam aumento do índice de proliferação celular (Ki67), alto grau histológico e recorrência mais precoce que os demais subtipos moleculares²⁹ (Figura 5).

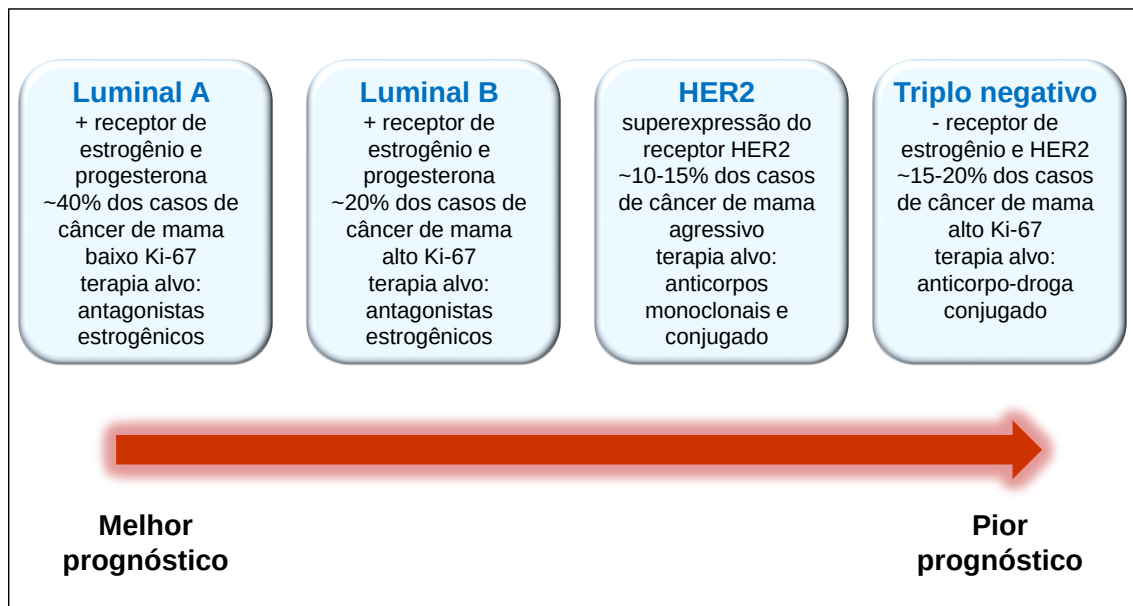


Figura 5. Classificação molecular do câncer de mama. Os tipos moleculares do câncer de mama caracterizam-se pela presença ou não de receptores de estrogênio e progesterona ou HER-2 e são determinantes à resposta terapêutica e prognóstico clínico.

2. Justificativa

A associação entre HDLc e câncer de mama é controversa o que decorre, em grande parte, da heterogeneidade da doença, vigência de terapias medicamentosas e comorbidades. Além disso, é possível que a determinação de HDLc ou apoA-I, como métricas de proteção, não seja suficientemente discriminante, considerando-se as diversas funções desempenhadas pelas partículas de HDL. Particularmente, a HDL minimiza a oxidação da LDL o que é refletido, *in vitro*, pelo retardo na oxidação destas lipoproteínas por agentes oxidantes. O maior aporte de colesterol em células tumorais e células infiltradas no microambiente tumoral favorece o processo proliferativo e metastático e é acompanhado por aumento de estresse oxidativo e inflamatório. Nos tumores de mama triplo-negativos observa-se aumento da concentração plasmática de lípidos, o que pode favorecer o suprimento destes compostos associados à maior agressividade deste tipo molecular de câncer de mama. A hipótese deste estudo é de que as HDL isoladas de mulheres com câncer de mama triplo-negativo possam apresentar alteração em sua capacidade antioxidante, em comparação às HDL isoladas de mulheres controles. Isto poderia modular o aporte de LDL ao tumor e o suprimento de colesterol necessário à replicação celular e proliferação tumoral.

3. Objetivos

Avaliar em mulheres recém- diagnosticadas com câncer de mama do tipo molecular triplo-negativo, nos estágios I ao IV, a composição da HDL em lípides e apo A-I e sua atividade antioxidante, caracterizada por sua habilidade em retardar a oxidação da LDL.

4. Métodos

4.1 Casuística

Estudo de coorte transversal, onde foram incluídas 27 mulheres, entre 30 e 80 anos de idade, com diagnóstico recente de câncer de mama triplo-negativo, virgens de tratamento. Outras 27 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 $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$), doenças autoimunes e imunossupressoras, tabagistas, etilistas, em uso de anticoncepcionais hormonais ou terapia hormonal, gestantes, com história previa 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. Todas as participantes foram incluídas no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo 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).

4.2 Obtenção de amostras de plasma e dosagens bioquímicas

Em ambos os grupos 15 mL de sangue foram colhidos após 12 h de jejum. O plasma foi obtido imediatamente por centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C.

Para obtenção da fração de plasma que contém apenas a HDL, as lipoproteínas que contêm apo B (VLDL e LDL) foram precipitadas por meio da adição de solução de sulfato de dextrana/cloreto de magnésio (1:1) ao plasma (100 $\mu\text{L/mL}$). 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 [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 Friedewald¹⁰ (Havel et al 1955), 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/apo B, os quais refletem a formação de LDL pequenas e densas.

4.3 Isolamento da HDL

Isolou-se a HDL ($D = 1.063 - 1.21$ g/mL) do plasma por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Havel et al 1955), 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 apo A-I foi determinada por imunoturbidimetria (Randox Laboratory Ltd).

4.4 Efeito inibitório da HDL sobre a oxidação da LDL “in vitro”

A HDL isolada foi incubada com LDL isolada de um doador saudável controle na presença de solução de sulfato de cobre. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) isolada do plasma foi dialisada utilizando PBS sem EDTA e, em seguida, diluída para uma concentração de 40 μg em 500 μL de água desmineralizada. Imediatamente após, foi adicionado 80 μg de proteína HDL do grupo controle ou câncer de mama, seguido de 1mL de solução de CuSO_4 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (concentração final) a 37°C . O tubo branco consistiu apenas de uma incubação de LDL e cobre. A cinética da formação dos dienos conjugados foi estabelecida pela variação da absorbância monitorada continuamente a 234 nm, durante 4 h, em intervalos de 3 min. O tempo (min) de resistência da LDL à oxidação (*lag time phase*) foi calculado entre o início da reação e o intervalo de tempo com a linha extrapolada da fase de propagação, e a razão máxima de formação de dienos conjugados, determinada pela absorbância máxima/minuto. Quanto menor este valor, mais lenta é a produção de dienos conjugados na LDL ^{10,30}.

5 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e organizados em dois grupos: o grupo controle, composto por mulheres saudáveis; e o grupo de câncer de mama, formado por mulheres diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo. Ambos foram caracterizados pela idade, IMC, menopausa, dislipidemia e hipertensão arterial. Os grupos câncer de mama foram caracterizados em relação ao estágio clínico da doença, presença de história familiar de câncer de mama e tipo molecular.

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.

Para todo o estudo, foi considerado 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 *GraphPad Prisma* (versão 5.04) *for Windows* e *for Mac* (versão 9.3.1) e Microsoft® *Excel for Mac* (versão 16.62) foram utilizados para tabulação e análise de dados.

6 Resultados

Entre novembro de 2019 e janeiro de 2021, foram colhidas amostras de sangue de 200 mulheres portadoras de câncer de mama e 150 controles, em casuística de projeto de pesquisa que avalia a funcionalidade da HDL no câncer de mama. Destas participantes, foram selecionadas aquelas portadoras de tumor com classificação molecular do tipo triplo-negativo, pareadas com mulheres controles por idade e IMC. As características antropométricas e clínicas das mulheres do grupo controle e câncer de mama encontram-se na tabela 1. O perfil menopáusico foi semelhante entre os grupos.

Tabela 1. Idade, IMC e perfil menopáusico nos grupos controle e câncer de mama triplo-negativo.

	Controle	Câncer de mama
n	27	27
Idade (anos)*	52 (43,5 – 58,5)	54 (41,0 – 61,0)
IMC (kg/m ²)*	28 (24,4 – 29,7)	28 (24,2 – 31,6)
Menopausa (%)	66,7	66,7

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

O perfil de lípidos plasmáticos, incluindo-se a razões CT/apoB e TG/HDLc que indicam a formação de LDL pequenas e densas, mais aterogênicas, foi semelhante entre os grupos controle e câncer de mama, conforme evidenciado na tabela 2.

Tabela 2. Perfil de lípides plasmáticos nos grupos controle e câncer de mama triplo-negativo.

	Controle	Câncer de mama
n	27	27
CT (mg/dL)	184 (142 – 201)	202 (175 – 218)
TG (mg/dL)	87 (58 – 122)	104 (96 – 144)
HDLc (mg/dL)	43 (34 – 46)	42 (37 – 48)
VLDLc (mg/dL)	17 (12 – 24)	21 (19 – 28)
LDLc (mg/dL)	117 (93 – 138)	132 (97 – 152)
não HDLc (mg/dL)	136 (104 – 160)	161 (135 – 177)
apoB (mg/dL)	98 (83 – 143)	135 (106 – 165)
CT/apoB	1,52 (1,37 – 2,06)	1,46 (1,24 – 2,02)
TG/HDLc	1,76 (1,24 – 3,12)	2,54 (2,07 – 3,46)

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. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; dados em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). CT = colesterol total; TG = triglicérides; apoB = apolipoproteína B; VLDLc = colesterol na VLDL; LDLc = colesterol na LDL; HDLc = colesterol na HDL.

As mulheres do grupo câncer de mama foram subdivididas de acordo com o estágio clínico da doença localizada (estágios I e II) e avançada (estágios III e IV). Não houve diferença entre idade e IMC entre estes grupos (Tabela 3).

Tabela 3 – Idade e IMC em mulheres do grupo controle e com câncer de mama triplo-negativo de acordo com o estágio clínico da doença.

	Controle	Estágios I e II	Estágios III e IV
n	27	13	14
Idade (anos)	52 (43,5 – 58,5)	54 (40 – 62)	54 (45 – 61)
IMC (kg/m ²)	28 (24,4 – 29,7)	29 (24 – 31)	27 (24 – 31)

As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis; valores em mediana e intervalos interquartílicos 25%-75%. IMC = índice de massa corporal.

Conforme evidenciado na tabela 4, o estadiamento clínico da doença também não acarretou diferenças entre os grupos quanto ao perfil de lípidos plasmáticos.

Tabela 4 – Perfil de lípides plasmáticos em mulheres do grupo controle e câncer de mama triplo-negativo de acordo com o estágio clínico da doença.

	Controle	Estágios I e II	Estágios III e IV
n	27	13	14
CT (mg/dL)	184 (142 – 201)	191 (183 – 216)	207 (172 – 226)
TG (mg/dL)	87 (58 – 122)	118 (97 – 192)	101 (92 – 132)
HDLc (mg/dL)	43 (34 – 46)	44 (32 – 63)	48 (32 – 56)
VLDLc (mg/dL)	17 (12 – 24)	24 (19 – 38)	20 (18 – 26)
LDLc (mg/dL)	117 (93 – 138)	114 (95 – 141)	138 (118 – 155)
Não-HDLc (mg/dL)	136 (104 – 160)	159 (131 – 174)	164 (144 – 188)
apoB (mg/dL)	98 (83 – 143)	139 (110 – 171)	136 (101 – 156)
TG/HDLc	1,76 (1,24 – 3,12)	2,16 (1,94 – 2,35)	2,62 (2,33 – 2,91)
CT/apoB	1,52 (1,37 – 2,06)	1,35 (1,17 – 1,92)	1,81 (1,40 – 2,08)

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 pós-teste de Bonferroni; valores em mediana e intervalos interquartílicos (25-75%).

A composição da partícula de HDL isolada do grupo controle e câncer de mama em CT, TG, FL e apo A-I foi semelhante (Tabela 5).

Tabela 5. Composição em lípides e apo A-I da HDL nos grupos controle e câncer de mama triplo-negativo.

	Controle	Câncer de mama
	(n= 27)	(n = 27)
CT (mg/dL)	46,8 (38,0 – 57,0)	43,7 (30,2 – 55,8)
TG (mg/dL)	15,3 (11,5 – 24,3)	22,5 (14,0 – 83,7)
FL (mg/dL)	86,4 (69,7 – 102,4)	88,7 (76,5 – 115,2)
apo A-I (mg/dL)	104,4 (73,4 – 143,7)	101,2 (82,4 – 120,0)

A HDL foi isolada por ultracentrifugação do plasma em gradiente descontínuo de densidade e a composição de lípides e apoA-I determinada, respectivamente, por métodos enzimáticos colorimétricos e imunoturbidimetria. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney; valores em mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%). CT = colesterol total; TG = triglicérides; FL = fosfolípides.

Conforme demonstrado na figura 1A, o tempo de retardo na oxidação de LDL foi maior durante a incubação com HDL do grupo câncer de mama, destacando uma melhor atividade antioxidante dessas lipoproteínas, em comparação com aquelas isoladas de mulheres no grupo controle. Isto foi observado independentemente de variação na composição de lípides e apoA-I na partícula de HDL (tabela 4). A atividade antioxidante da HDL foi semelhante entre doença localizada e avançada e maior na doença avançada em comparação ao grupo controle (figura 6B).

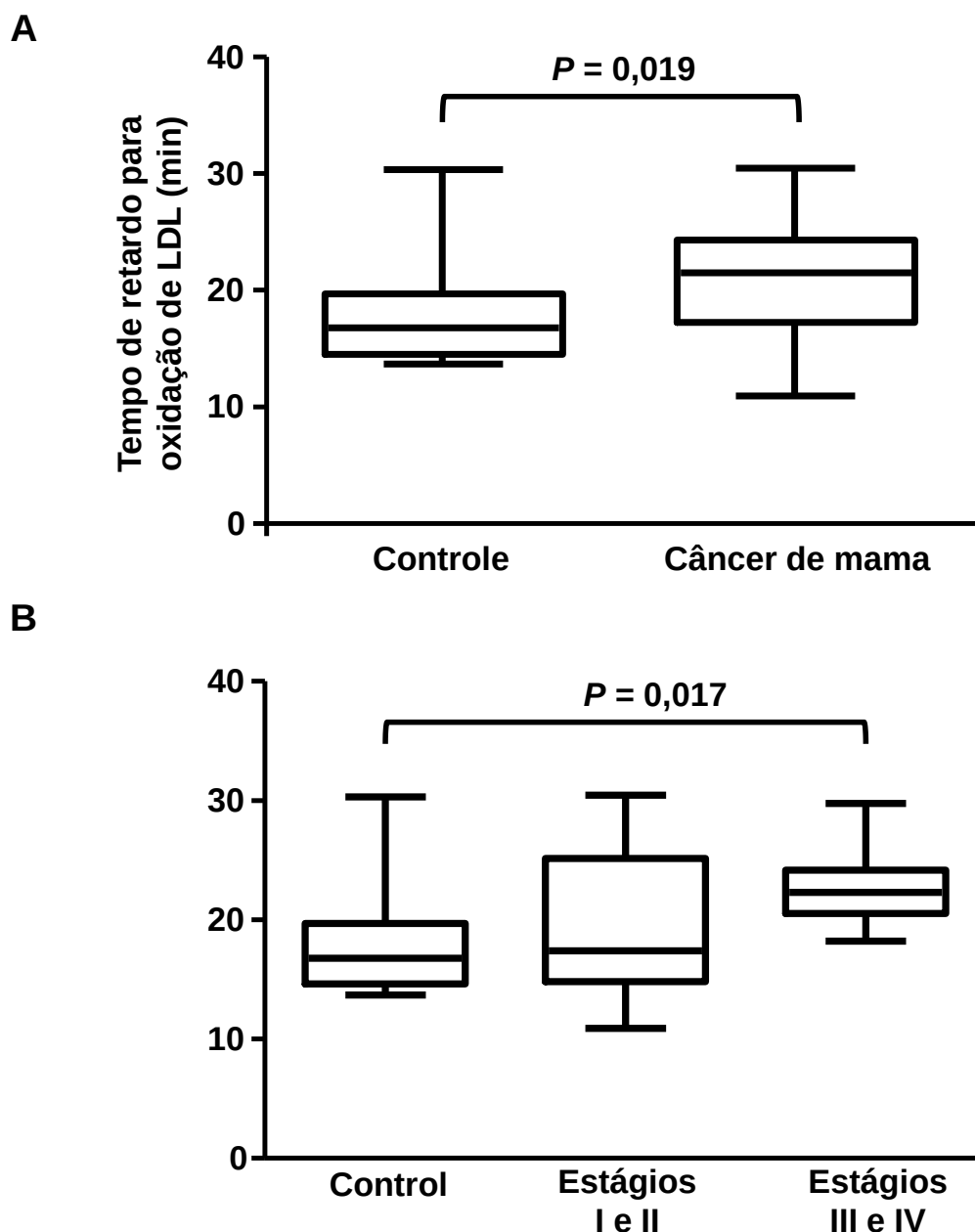


Figura 6. Tempo de retardo da oxidação da LDL na presença de HDL isolada do grupo controle e câncer de mama triplo-negativo. O tempo de retardo de oxidação de LDL foi determinado pela incubação de LDL de *pool*/controle com HDL isolada do grupo controle ($n = 27$) e câncer de mama ($n = 27$) na presença de solução de sulfato de cobre por 4h. A absorbância foi controlada em 234 nm, a cada 3 min. As comparações foram feitas entre o grupo controle e o câncer de mama (A) e entre o grupo controle e os estágios clínicos do câncer de mama: estágios I e II, doença localizada, e estágios III e IV, doença avançada (B). As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Bonferroni.

A razão máxima de formação de dienos conjugados foi semelhante entre os grupos e entre os estágios clínicos do câncer de mama (figura 7 A e B).

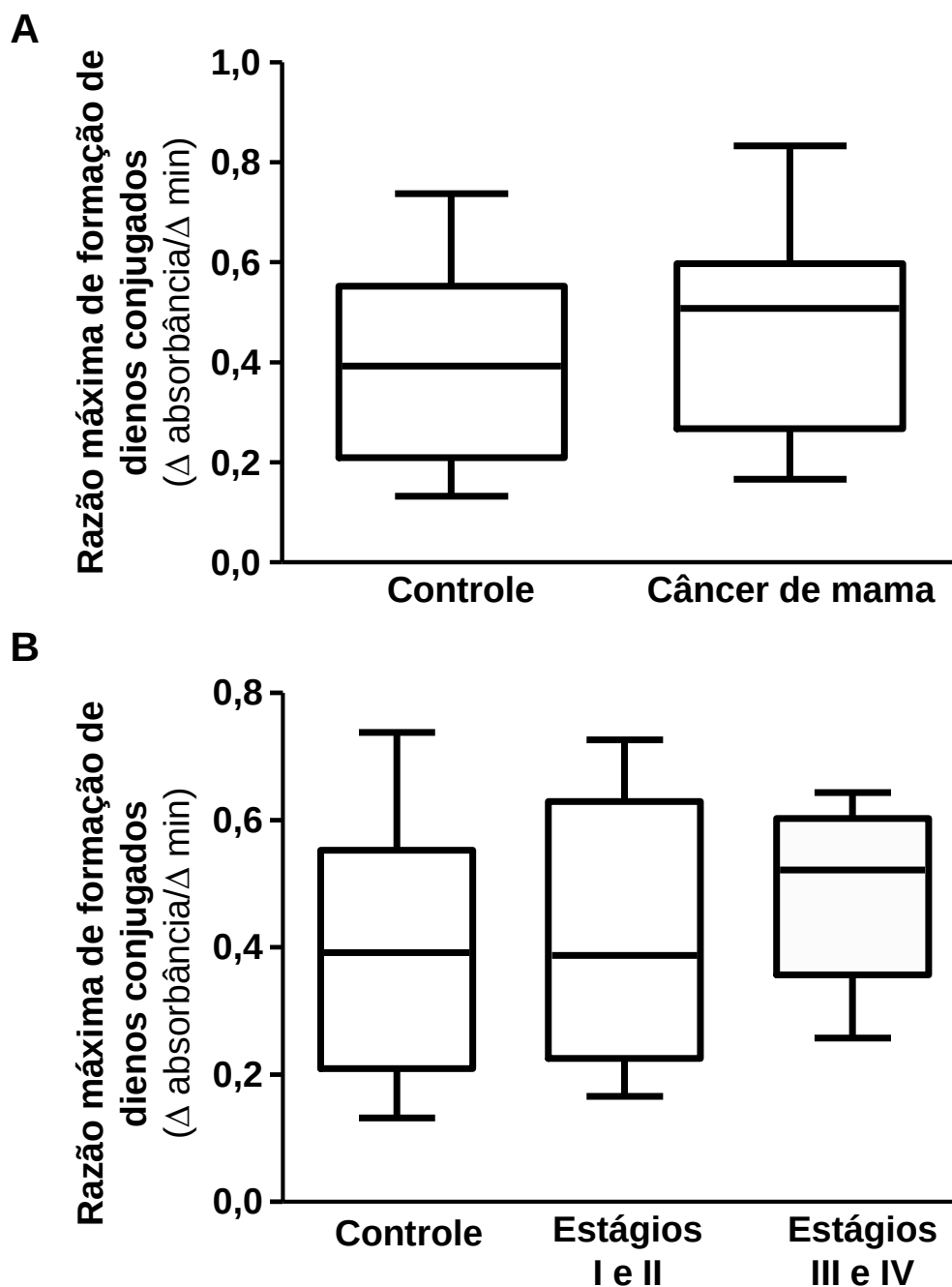


Figura 7. Razão máxima de formação de dienos conjugados em LDL incubada na presença de HDL do grupo controle e câncer de mama triplo-negativo. A razão máxima de formação de dienos conjugados em LDL foi determinado pela incubação de LDL de pool controle com HDL isolada do grupo controle ($n = 27$) e câncer de mama triplo-negativo ($n = 27$) na presença de solução de sulfato de cobre, por 4h. A absorbância foi monitorada a 234 nm, a cada 3 min. As comparações foram feitas entre grupo controle e câncer de mama

(A) e entre grupo controle e estágios clínicos do câncer de mama – estágios I e II, doença localizada e estágios III e IV, doença avançada (B). As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Bonferroni.

A atividade antioxidante da HDL, inferida pelo tempo de retardo para a oxidação de LDL, foi positivamente correlacionada com a concentração de apo A-I na partícula de HDL das mulheres com câncer de mama (figura 8).

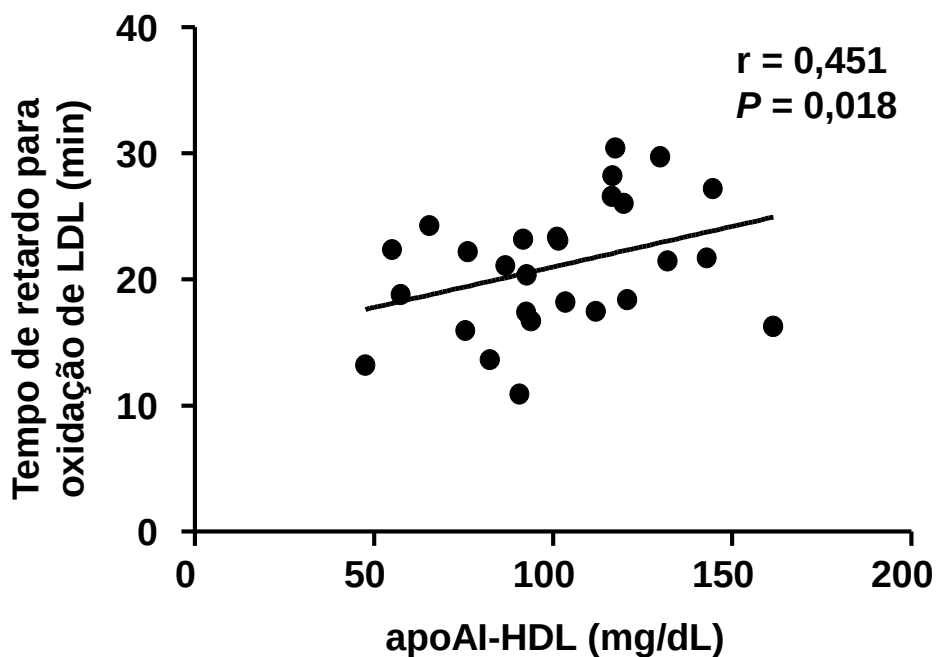


Figura 8. Correlação entre apoA-I na HDL do grupo câncer de mama e atividade antioxidante. A atividade antioxidante da HDL foi inferida pela determinação do tempo de retardo de oxidação de LDL. LDL de pool controle foi incubada com HDL na presença de solução de sulfato de cobre, por 4h. A absorbância foi monitorada a 234 nm, a cada 3 min. A associação entre as variáveis foi analisada pelo teste de correlação de Spearman.

7 Discussão

Na presente investigação demonstrou-se que a capacidade antioxidante da partícula de HDL isolada de mulheres com câncer de mama triplo-negativo é maior quando comparada à de mulheres controles, particularmente nos estágios mais avançados da doença. Este evento foi observado a despeito da concentração semelhante de HDLc, lípides plasmáticos e apo A-I entre os grupos.

As alterações no perfil de lípidos e lipoproteínas plasmáticas são apontadas como contribuintes independentes para o risco de câncer de mama em mulheres, independentemente do estado menopáusico³¹. No entanto, as dislipidemias encontram-se, frequentemente, presentes em associação a outras condições de risco ao câncer de mama, como diabetes mellitus e obesidade.

Os achados de vários estudos clínicos importantes, sugerem associação direta entre o LDLc e o risco de câncer de mama, e uma relação inversa entre o HDLc circulante e o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Todavia, esses resultados não foram replicados em alguns estudos epidemiológicos³². Apesar da falta de evidências epidemiológicas, o crescimento de tecidos tumorais benignos e malignos tem sido associado com alterações nas concentrações plasmáticas de lípidos e lipoproteínas em pacientes com câncer de mama. Vários trabalhos descobriram que muitas vias de sinalização causadoras de câncer, afetam a produção de colesterol, significando assim que estes desempenham um papel na formação do tumor³³.

Embora pequena, a casuística do presente estudo não evidenciou diferença no perfil de lípidos plasmáticos, particularmente HDLc, e razões lipídicas entre mulheres do grupo controle e câncer de mama, diferentemente do descrito em outros estudos. As mulheres de ambos os grupos foram também semelhantes quanto à idade, IMC e estado menopáusico. Mesmo quando subdivididas de acordo com o estadiamento clínico da doença, não foram observadas diferenças nas características antropométricas, estado menopáusico e lípidos plasmáticos. Não foram, entretanto, considerados neste estudo componentes da síndrome metabólica devido à logística de atendimento e coleta de amostras das participantes.

As HDL exercem diversas ações que figuram como protetoras ao desenvolvimento de várias doenças crônicas não degenerativas, embora sua associação especificamente com a prevenção do câncer de mama seja bastante discutida. Isto se deve ao fato de que a redução do HDLc se encontra associada à fatores de risco para o câncer, como a menopausa, diabetes mellitus, obesidade e resistência insulínica^{34,35}.

Concentrações reduzidas de HDLc associam-se à diminuição da sobrevida global²⁴, ao pior prognóstico e sobrevida do câncer de mama do tipo molecular triplo-negativo¹⁸ e à maior incidência de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa²³. Um estudo prospectivo com um período de acompanhamento de 11,5 anos encontrou uma associação inversa entre HDLc e risco de câncer de mama³⁶ e dados clínicos coletados retrospectivamente mostraram que a redução de HDLc teve uma associação significativa com pior sobrevida global em câncer de mama²¹, pior prognóstico e sobrevida em tumores triplo-negativo³³ e maior risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa³⁷. Além disso, baixo HDLc foi associado a características tumorais mais agressivas¹. De outro lado, concentrações de HDLc menor que 50mg/dL foram modestamente vinculados ao risco de câncer de mama no estudo³⁸. Há, ainda, estudos que demonstram que a elevação do HDLc, por causas genéticas ou medicamentosas, associa-se ao maior risco de câncer de mama^{39,40}, ou, ainda, a falta de associação com risco de câncer de mama ou sobrevida^{21,36,41}.

Importante considerar que a métrica para inferir proteção conferida pela HDL - por meio da determinação do conteúdo de colesterol na partícula (HDLc) - parece falhar na predição de risco à semelhança do que ocorre para a doença macrovascular aterosclerótica. Este evento reside no fato de o HDLc não refletir, invariavelmente, a funcionalidade da HDL, em especial, suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e de remoção de colesterol celular. As controvérsias quanto à associação entre HDL e câncer de mama também residem frente às diferentes populações estudadas e tamanho amostral. Tempo de duração da doença, tipos histológicos e moleculares, bem como influências impostas pela presença de comorbidades metabólicas ligadas ao risco de tumores mamários, terapias oncológicas e alteração em estilo de vida também podem agregar viés às análises.

A composição da partícula de HDL em CT, TG, FL e apo A-I foi semelhante entre as mulheres do grupo controle e câncer de mama e, também, entre os estágios iniciais e avançados da doença. Sendo, assim, a maior atividade antioxidante observada na HDL do grupo câncer de mama (aumento de 22 % no tempo de retardo para oxidação de LDL) e, mais especificamente, nos estágios avançados da doença não pode ser imputada à alteração em componentes clássicos de sua composição. No entanto, sabidamente, as HDL transportam uma gama de proteínas e lípidos bioativos que compõem sua proteômica e lipidômica. Estes não são facilmente determinados por técnicas laboratoriais mais simples, mas podem ser determinantes à sua atividade na modulação da oxidação de LDL e membranas celulares.

A HDL ancora diversas enzimas em sua estrutura, particularmente a PON-1 que atua na hidrólise de peróxidos lipídicos, minimizando a oxidação da LDL e o consequente aporte de colesterol e óxidos de colesterol às células tumorais⁴². A concentração e a atividade da PON-1 não foram determinadas no presente estudo, mas podem contribuir para a resposta antioxidante observada. Vários estudos relatam uma diminuição na atividade da PON-1 em pacientes com câncer^{43,44}. Isso pode indicar propriedade de defesa prejudicada contra o estresse oxidativo com potenciais implicações para a proliferação celular, promoção de instabilidade gênica e alterações na suscetibilidade celular à quimioterapia. Existe uma correlação consistente entre câncer e diminuição da atividade sérica de PON1. Esses resultados podem abrir caminhos promissores de pesquisa com relevância clínica e compreensão da dinâmica molecular subjacente à carcinogênese⁴⁵.

Neste estudo o tempo de retardo de oxidação da LDL em minutos foi, positivamente, correlacionado com o conteúdo de apo A-I na partícula de HDL. A apo A-I é um dos componentes da HDL que favorece a atividade antioxidante desta lipoproteína¹⁶, assim como a PON-1. Entretanto, elevada concentração de apo-AI foi associada à uma alta incidência de câncer de mama. Por outro lado, a incidência de câncer de mama foi menor entre as mulheres com concentração mais elevada de apoB e da razão apoB/apo-AI⁴⁶. Estes achados foram surpreendentes em todos os modelos de regressão. No entanto, até recentemente, a associação entre apolipoproteína e câncer de mama não foi avaliada em estudos maiores.

Tumores sólidos contêm grande quantidade de lípides^{47,48}, graças ao aumento de sua síntese e da captação de lipoproteínas^{7,47}, por intermédio de receptores *scavenger*. Em particular, a maior expressão de SR-BI vincula-se à maior agressividade dos tumores e ao seu prognóstico desfavorável⁴⁹⁻⁵²; enquanto alteração em sua funcionalidade, por mutações relacionam-se à inibição da proliferação tumoral⁵¹. Potenciais biomarcadores lipídicos (ceramidas, fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina e diacilglicerol) foram selecionados no câncer de mama triplo-negativo, reforçando a alteração no perfil lipídico e o possível suprimento de lípidos neste tumor mais agressivo⁴⁷.

Na casuística completa de mulheres com câncer de mama, incluindo-se todos os tipos moleculares (n = 186, da qual foram obtidos os casos triplo-negativos do presente estudo, foi comparada a composição da HDL com mulheres controles (n = 150). Não houve registro do padrão alimentar e grau de atividade física das participantes do estudo. No câncer de mama, a HDL foi menos enriquecida em CT, FL e óxidos de colesterol (particularmente, 27 hidroxicoolesterol) o que pode evidenciar menor remoção de lípidos celulares. A análise *in vitro*, entretanto, da capacidade intrínseca da HDL em remover colesterol celular demonstrou que o efluxo de colesterol de macrófagos foi semelhante entre HDL isolada do câncer de mama e de controles. De outro lado, em estágios avançados da doença (estágios III e IV), apesar da composição semelhante em apoA-I e lípidos, a HDL apresentou menor capacidade de remoção de colesterol de macrófagos em comparação à HDL de estágios clínicos iniciais do câncer de mama¹⁷.

À semelhança do presente estudo, a atividade anti-inflamatória da HDL foi maior no câncer de mama (n = 38), em comparação ao grupo controle (n = 9), independentemente do tipo molecular. Entretanto, nos estágios mais avançados da doença (estágios III e IV), a capacidade da HDL de inibição da secreção de citocinas inflamatórias por macrófagos foi maior do que nos estágios iniciais (I e II) (dados não publicados).

Não é possível por meio desses achados inferir qual a exata contribuição da HDL para a evolução do tumor, uma vez que ela pode também ser modificada no leito tumoral. Assim, os resultados observados na HDL isolada do plasma podem ser por causação reversa e, não necessariamente refletirem efeito causal sobre a gênese e evolução do câncer. O conceito de modulação da HDL pelo

tumor por causação reversa pode desvincular a HDL como determinante direta de risco tumoral, sendo mais relacionada como marcadora de evolução do tumor do que propriamente protetora ou indutora de sua gênese.

A inflamação e a oxidação acompanham o microambiente tumoral e podem modificar a funcionalidade da HDL. Neste sentido, marcadores inflamatórios ligam-se às HDL desacoplando apoA-I de sua estrutura o que compromete sua funcionalidade¹⁶.

No presente estudo, os resultados evidenciaram, pela primeira vez, o papel da HDL como defesa antioxidante em tumores de mama triplo-negativo. Isto ocorreu independentemente de alterações na composição da partícula de HDL e do perfil de lípides plasmáticos. A maior atividade antioxidante, refletida pelo retardo na oxidação de LDL mesmo sem alteração na razão máxima de formação de dienos conjugados, em tumores triplo-negativo em estágios avançados poderia contribuir para limitar o estresse oxidativo e inflamatório nesses tumores com pior prognóstico clínico e terapêutico. Ao reduzir a oxidação da LDL, a HDL reduziria o aporte de colesterol e óxidos de colesterol ao microambiente tumoral, por intermédio da LDL oxidada. Além disso, limitaria a propagação de vias de sinalização que resultam em processos de transição epitélio- mesenquimal e metástase. Os resultados reiteram que a determinação de HDLc não representa a melhor métrica para inferir a associação da HDL com o risco câncer de mama e, possivelmente, a evolução da doença.

8 Considerações Finais

1. A concentração de lípides plasmáticos foi semelhante entre mulheres controles e com câncer de mama triplo-negativo, recém diagnosticadas e virgens de tratamento;
2. A composição da partícula de HDL, em colesterol total, triglicérides, fosfolípidos e apo A-I foi semelhante entre mulheres controles e com câncer de mama triplo-negativo;
3. A HDL isolada do câncer de mama apresenta maior atividade antioxidante, refletida pela habilidade em retardar a oxidação de LDL *in vitro*;
4. No câncer de mama, a HDL isolada de mulheres com doença nos estágios III e IV apresenta maior capacidade antioxidante;
5. a atividade antioxidante da HDL foi positivamente correlacionada com seu conteúdo em apo A-I.

9 Referências

1. Løfterød T, Mortensen ES, Nalwoga H, Wilsgaard T, Frydenberg H, Risberg T, et al. Impact of pre-diagnostic triglycerides and HDL-cholesterol on breast cancer recurrence and survival by breast cancer subtypes. *BMC Cancer*. 15 de junho de 2018;18(1):654.
2. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet Lond Engl*. 16 de agosto de 2014;384(9943):618–25.
3. Quintão EC. Lípidos do metabolismo à aterosclerose. 1ª edição. Sarvier; 2011.
4. Trigatti BL. SR-B1 and PDZK1: partners in HDL regulation. *Curr Opin Lipidol*. abril de 2017;28(2):201–8.
5. Wei Y, Huang Y, Yang W, Huang Q, Chen Y, Zeng K, et al. The significances and clinical implications of cholesterol components in human breast cancer. *Sci Prog*. 2021;104(3):368504211028395.
6. Zhang Y, Gordon SM, Xi H, Choi S, Paz MA, Sun R, et al. HDL subclass proteomic analysis and functional implication of protein dynamic change during HDL maturation. *Redox Biol*. junho de 2019;24:101222.
7. Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol Chem*. janeiro de 2015;396(1):1–11.
8. Collier TS, Jin Z, Topbas C, Bystrom C. Rapid Affinity Enrichment of Human Apolipoprotein A-I Associated Lipoproteins for Proteome Analysis. *J Proteome Res*. 2 de março de 2018;17(3):1183–93.
9. Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. Effects of Air Pollution on Heart Rate Variability: The VA Normative Aging Study. *Environ Health Perspect*. março de 2005;113(3):304–9.
10. Iborra RT, Ribeiro ICD, Neves MQTS, Charf AM, Lottenberg SA, Negrão CE, et al. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports*. dezembro de 2008;18(6):742–50.
11. Kjeldsen EW, Nordestgaard LT, Frikke-Schmidt R. HDL Cholesterol and Non-Cardiovascular Disease: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 27 de abril de 2021;22(9):4547.
12. Azevedo BRM de, Pinheiro DN, Joaquim MJM. Cardiovascular diseases: cardiovascular risk factors and cognition. *Rev SBPH*. dezembro de 2017;20(2):25–44.
13. Incidência [Internet]. Instituto Nacional de Câncer - INCA. [citado 01 de novembro de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2022/09/doencas-cardiovasculares-principal-cao-de-morte-no-mundo-pode-ser-prevenida>

14. Nicholls SJ, Nelson AJ. HDL and cardiovascular disease. *Pathology (Phila)*. fevereiro de 2019;51(2):142–7.
15. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 10 de maio de 2019;124(10):1505–18.
16. Cedó L, Reddy ST, Mato E, Blanco-Vaca F, Escolà-Gil JC. HDL and LDL: Potential New Players in Breast Cancer Development. *J Clin Med*. 14 de junho de 2019;8(6):853.
17. Sawada MIBAC, Santana MFM, Assis, S, Nunes VS, Passarelli M. 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]: Universidade Nove de Julho; 2021.
18. Mazzuferi G, Bacchetti T, Islam MO, Ferretti G. High density lipoproteins and oxidative stress in breast cancer. *Lipids Health Dis*. 25 de outubro de 2021;20(1):143.
19. Rositch AF, Unger-Saldaña K, DeBoer RJ, Ng'ang'a A, Weiner BJ. The role of dissemination and implementation science in global breast cancer control programs: Frameworks, methods, and examples. *Cancer*. 15 de maio de 2020;126 Suppl 10:2394–404.
20. Won KA, Spruck C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol*. dezembro de 2020;57(6):1245–61.
21. Li X, Tang H, Wang J, Xie X, Liu P, Kong Y, et al. The effect of preoperative serum triglycerides and high-density lipoprotein-cholesterol levels on the prognosis of breast cancer. *Breast Edinb Scotl*. abril de 2017;32:1–6.
22. Yung RL, Ligibel JA. Obesity and breast cancer: risk, outcomes, and future considerations. *Clin Adv Hematol Oncol HO*. outubro de 2016;14(10):790–7.
23. Bobin-Dubigeon C, Nazih H, Blanchard V, Croyal M, Bard JM. Circulating HDL and Non-HDL Associated Apolipoproteins and Breast Cancer Severity. *J Clin Med*. 28 de fevereiro de 2022;11(5):1345.
24. Ganjali S, Ricciuti B, Pirro M, Butler AE, Atkin SL, Banach M, et al. High-Density Lipoprotein Components and Functionality in Cancer: State-of-the-Art. *Trends Endocrinol Metab TEM*. janeiro de 2019;30(1):12–24.
25. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. março de 2015;65(2):87–108.
26. Incidência [Internet]. Instituto Nacional de Câncer - INCA. [citado 10 de janeiro de 2022]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

27. Zhao P, Li T, Li Z, Cao L, Wang Y, Wang Y, et al. Preparation of Gold Nanoparticles and Its Effect on Autophagy and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease Cell Model. *J Nanosci Nanotechnol*. 1º de fevereiro de 2021;21(2):1266–71.
28. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. outubro de 2015;24(10):1495–506.
29. Ginsburg O, Yip CH, Brooks A, Cabanes A, Caleffi M, Dunstan Yataco JA, et al. Breast cancer early detection: A phased approach to implementation. *Cancer*. 15 de maio de 2020;126 Suppl 10(Suppl 10):2379–93.
30. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. outubro de 1992;13(4):341–90.
31. Kim Y, Park SK, Han W, Kim DH, Hong YC, Ha EH, et al. Serum high-density lipoprotein cholesterol and breast cancer risk by menopausal status, body mass index, and hormonal receptor in Korea. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. fevereiro de 2009;18(2):508–15.
32. Pandrangi SL, Chittineedi P, Chikati R, Mosquera JAN, Llaguno SNS, Mohiddin GJ, et al. Role of Lipoproteins in the Pathophysiology of Breast Cancer. *Membranes*. 19 de maio de 2022;12(5):532.
33. Fan W, Chang J, Fu P. Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies. *Future Med Chem*. agosto de 2015;7(12):1511–9.
34. Borgquist S, Jirström K, Anagnostaki L, Manjer J, Landberg G. Anthropometric factors in relation to different tumor biological subgroups of postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer*. 15 de janeiro de 2009;124(2):402–11.
35. Ligibel JA, Strickler HD. Obesity and its impact on breast cancer: tumor incidence, recurrence, survival, and possible interventions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet*. 2013;52–9.
36. His M, Zelek L, Deschasaux M, Pouchieu C, Kesse-Guyot E, Hercberg S, et al. Prospective associations between serum biomarkers of lipid metabolism and overall, breast and prostate cancer risk. *Eur J Epidemiol*. fevereiro de 2014;29(2):119–32.
37. 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.
38. 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. *Ann Epidemiol*. setembro de 2008;18(9):671–7.

39. Novak J, Besic N, Dzodic R, Gazic B, Vogrin A. Pre-operative and intra-operative detection of axillary lymph node metastases in 108 patients with invasive lobular breast cancer undergoing mastectomy. *BMC Cancer*. 5 de fevereiro de 2018;18(1):137.
40. Zhou Y, Luo G. Apolipoproteins, as the carrier proteins for lipids, are involved in the development of breast cancer. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex*. novembro de 2020;22(11):1952–62.
41. Chandler P, Kochupurakkal Bs, S A, Al R, Di S, Si K. Subtype-specific accumulation of intracellular zinc pools is associated with the malignant phenotype in breast cancer. *Mol Cancer [Internet]*. 1º de maio de 2016 [citado 15 de dezembro de 2022];15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26728511/>
42. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*. janeiro de 2017;132:19–27.
43. Medina-Díaz IM, Ponce-Ruiz N, Rojas-García AE, Zambrano-Zargoza JF, Bernal-Hernández YY, González-Arias CA, et al. The Relationship between Cancer and Paraoxonase 1. *Antioxid Basel Switz*. 31 de março de 2022;11(4):697.
44. Thompson EW, Demissei BG, Smith AM, Brahmbhatt P, Wang J, Clark A, et al. Paraoxonase-1 Activity in Breast Cancer Patients Treated With Doxorubicin With or Without Trastuzumab. *JACC Basic Transl Sci*. janeiro de 2022;7(1):1–10.
45. Arenas M, Rodríguez E, Sahebkar A, Sabater S, Rizo D, Pallisé O, et al. Paraoxonase-1 activity in patients with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1º de julho de 2018;127:6–14.
46. Borgquist S, Butt T, Almgren P, Shiffman D, Stocks T, Orho-Melander M, et al. Apolipoproteins, lipids and risk of cancer. *Int J Cancer*. 1º de junho de 2016;138(11):2648–56.
47. de Gonzalo-Calvo D, López-Vilaró L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vázquez T, Escuin D, et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer*. 9 de junho de 2015;15:460.
48. Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. *J Cell Biochem*. 1º de janeiro de 2004;91(1):54–69.
49. Danilo C, Gutierrez-Pajares JL, 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 BCR*. 2013;15(5):R87.

50. Ha M, Sung J, Song YM. Serum total cholesterol and the risk of breast cancer in postmenopausal Korean women. *Cancer Causes Control CCC*. setembro de 2009;20(7):1055–60.
51. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol*. janeiro de 2011;178(1):402–12.
52. Yuan B, Wu C, Wang X, Wang D, Liu H, Guo L, et al. High scavenger receptor class B type I expression is related to tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. março de 2016;37(3):3581–8.

ANEXO A - Aprovações dos Comitês de Ética



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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: 04096218.5.0000.5511

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 lipídeos, 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

Telefone: (11)3385-9010

CEP: 01.504-001

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 glioxalase 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 Mattar e Dr. Luiz Henrique Gebrim). 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

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

CEP: 01.504-001

E-mail: comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



Continuação do Parecer: 3.139.460

HDL serão mantidas a -80°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 glioxalase 1 no

plasma A atividade plasmática da glioxalase 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 HDL2 e HDL3 serão isoladas do plasma, imediatamente após sua obtenção, por ultracentrifugação em gradiente descontinuo de densidade. Após diálise contra solução de tampão fosfato contendo EDTA, serão armazenadas em solução de sacarose a -80°C . Quantificação de óxidos de colesterol no plasma total e na HDL por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-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}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 glicoxalase 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.

Crterios de incluso: Para tanto, sero includas pacientes do sexo feminino, entre 18 e 70 anos de idade, com diagnstico recente de cncer de mama, virgens de tratamento e com a classificao molecular e estadiamento prognstico clnico do tumor de I e II. Mulheres saudveis na mesma faixa etria, pareadas por idade e ndice de massa corporal sero includas como grupo controle.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primrio: Avaliar em mulheres recem diagnosticadas com cncer de mama invasivo, estgios I e II: - a associao entre a concentrao plasmtica de oxidos de colesterol, produtos de glicao avanada, glicoxalase 1 e receptor solvel de AGE com o prognstico da doena de acordo com sua classificao molecular ; - a concentrao de oxidos de colesterol nas subfraes lipoproteinas de alta densidade (HDL2 e HDL3) e sua habilidade em remover colesterol celular e inibir a oxidao; e- a relao entre as variveis metablicas supracitadas e o escore de recorrncia de 21 genes (Oncotype DX – Recurrence score).

Avaliao dos Riscos e Benefcios:

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

Endereo: VERGUEIRO n 235/249

Bairro: LIBERDADE

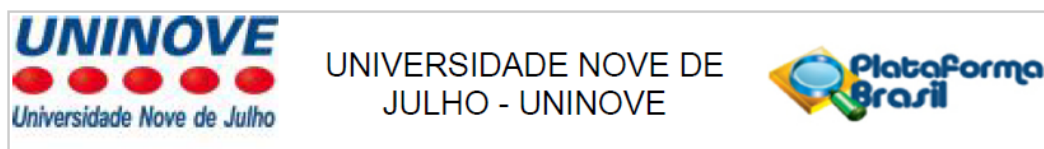
UF: SP

Telefone: (11)3385-9010

Municpio: SAO PAULO

CEP: 01.504-001

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 TCLE os dados do CEP 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 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

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 CEP 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_BASICAS_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: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comitedeetica@uninove.br



UNIVERSIDADE NOVE DE
JULHO - UNINOVE



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 glioxalase 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 Daniele 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 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

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



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, glicoxalase 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

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	projeto-final.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 Profª. Drª. MARISA PASSARELLI, como parte das teses de doutorado das alunas MARIA ISABELA B.A.CALDAS SAWADA e DANIELE CAZONI BALTHAZAR, 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

ANEXO B – TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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. 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, 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 Luis Antônio, 683, Bela Vista, São Paulo/SP, CEP 01317-010, telefones 11 3248 8087 ou 11 3248 8080, e-mail dircient@gmail.com; ou Comitê de Ética 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.

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 de 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. No Centro de Referência da Saúde da Mulher você poderá procurar informações com a Dra. Maria Isabela Bloise Alves Caldas Sawada, Avenida Brigadeiro Luís 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, 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; 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.

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 Lípides (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: