

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

Lucas Alves Pereira

PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA NO PLASMA DE
MULHERES COM DIAGNÓSTICO RECENTE DE CÂNCER DE
MAMA EM DIFERENTES ESTÁGIOS E CLASSIFICAÇÃO
MOLECULAR DA DOENÇA

São Paulo, SP

2023

**Universidade Nove de Julho
Projeto de Pesquisa
Mestrado**

**PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA NO PLASMA DE
MULHERES COM DIAGNÓSTICO RECENTE DE CÂNCER DE
MAMA EM DIFERENTES ESTÁGIOS E CLASSIFICAÇÃO
MOLECULAR DA DOENÇA**

Aluno: Lucas Alves Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

- *Este estudo foi desenvolvido na Universidade Nove de Julho, sob a supervisão da Dra. Marisa Passarelli, com a colaboração do Centro de Referência da Saúde da Mulher - Hospital Pérola Byington e do Laboratório de Lípidos – LIM10 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.*

São Paulo
2023

Pereira, Lucas Alves.

Produtos de glicação avançada no plasma de mulheres com diagnóstico recente de câncer de mama em diferentes estágios e classificação molecular da doença. / Lucas Alves Pereira. 2023.

78 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

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

1. Câncer de mama. 2. Produtos de glicação avançada.

São Paulo, 20 de junho de 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

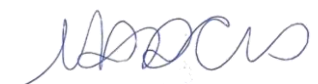
Aluno: **LUCAS ALVES PEREIRA.**

Título da dissertação: **PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA NO PLASMA DE MULHERES COM DIAGNÓSTICO RECENTE DE CÂNCER DE MAMA EM DIFERENTES ESTÁGIOS E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DA DOENÇA.**

Presidente: PROFA. DRA. MARISA PASSARELLI



Membro: PROFA. DRA. MARCIA SILVA QUEIROZ



Membro: PROFA. DRA. MARIA LUCIA CARDILLO CORREA GIANNELLA



AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu sincero agradecimento a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho. Sem o envolvimento de cada um de vocês, não teria sido possível alcançar o resultado final e compartilhar todo esse conhecimento com todos os envolvidos, inclusive comigo mesmo e com aqueles que buscam adquirir conhecimento sobre os temas abordados. Seu apoio foi fundamental e sou grato por terem feito parte dessa jornada;

- À Prof. Dra. Marisa Passarelli, minha orientadora, que além das qualidades excepcionais como pesquisadora, apresentou por diversos momentos em inúmeras situações, exemplos de como ser um educador. Os maiores aprendizados além do seu conteúdo proposto ensinado são como ele é repassado para seus alunos, dentro outros exemplos que carregarei para a vida como modelo a ser seguido, com todo meu respeito e admiração;

- Aos meus colegas de trabalho, Marina Eloi, Caroline Mônaco Moreira e Rafael Sales de Pinho e todos que compõem a equipe “somáticos” do time Genômica, onde, para que eu pudesse concluir essa caminhada me proporcionaram todo apoio e compreensão para isso;

- À equipe do Laboratório de Lípidos (LIM10) da Faculdade de Medicina da USP, em especial Monique Mello, Valeria Nunes, Kelly Gomes e a Claudia Souza por me receberem em plena pandemia e terem me mostrado os caminhos para a conclusão desse trabalho. Também a Sayonara Assis, Guilherme Ferreira, Gabriela Bueno, Danielle Ribeiro sempre auxiliando e compartilhando experiências;

- Aos colegas de pós-graduação Eduarda Palanca e Amarilis Campos (UNINOVE), pela parceria e cooperação no laboratório; Em especial a, Isabela Sawada por sempre auxiliar nesse trabalho, principalmente na bioestatística que em até chamadas de vídeo realizamos discussões sobre as melhores abordagens;

- À Dra. Mozânia Reis (UNINOVE e UBS Dra. Ilza W. Hutzler), cujo auxílio no recrutamento das voluntárias saudáveis foi de inestimável valor;

- A equipe do Hospital Pérola Byington por proporcionar o recrutamento das voluntárias e auxílio na coleta das amostras. Meus sinceros agradecimentos a toda a equipe de envolvidos nesse projeto.

- Aos professores e funcionários da UNINOVE, pelo suporte ao longo desta caminhada;

- Aos discentes do PPG da UNINOVE, pela companhia e aprendizado. Em especial ao Prof. Dr. Humberto Dellê por me introduzir a pesquisa e me inspirar a seguir os passos que percorro até hoje, uma das inspirações que carregarei para vida;

- Ao Meu amigo que por todos esses anos sempre esteve compartilhando pensamentos, teorias, abordagem que vão além da pesquisa, enriquecendo não só meu conhecimento teórico, mas também o abstrato e sempre presente para qualquer pedido de “socorro”, frente a qualquer dúvida. Um exemplo de pesquisador e amigo, Luiz Henrique Gomes Matheus.

- Aos meus familiares por proporcionarem que isso seja possível, em especial, meu pai Roberto Carlos Pereira e minha mãe, Genilda Brasil Alves Pereira.

- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa; A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento aos estudos.

Por fim, às voluntárias que participaram do estudo e assim contribuíram para novas perspectivas sobre o câncer de mama para esses estudos e futuros: meu enorme e sincero, Obrigado.

" A vida vale a pena quando você torce para ela não acabar..."

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

Produtos de glicação avançada (AGE), são prevalentes em diversas condições que contribuem para o câncer de mama. Eles favorecem insulto oxidativo e inflamatório e prejudicam a homeostase de lípidos. Os AGE são reconhecidos pelo receptor para AGE, AGER, que medeia vias de sinalização associadas à maior capacidade proliferativa e invasiva dos tumores de mama, cujo prognóstico se baseia em sua classificação molecular. Formas solúveis do AGER (sAGER) impedem a sinalização intracelular e são apontadas como moduladoras negativas das complicações crônicas mediadas pelos AGE. Avaliou-se em mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama, a concentração plasmática de AGE, sAGER e sua associação com o prognóstico da doença, de acordo com sua classificação molecular, e com o estadiamento clínico. Foram incluídas mulheres, entre 18 e 80 anos de idade, com diagnóstico recente de câncer de mama, virgens de tratamento e com classificação molecular e estadiamento clínico do tumor de I a IV (n = 179). Mulheres saudáveis pareadas por idade e índice de massa corporal foram incluídas como grupo controle (n = 148). As concentrações plasmáticas de AGE total, pentosidina foram determinadas por fluorimetria, e sAGER, por ELISA. A frequência dos tipos moleculares de câncer de mama foi luminal B (37,9%), luminal A (28,4%), HER2 (17,3%) e TN (16,2%). Os estágios iniciais da doença (I e II) representaram 68% e os avançados (estágios III e IV), 32% da amostra. A mediana de idade foi maior no grupo câncer de mama, bem como a frequência de mulheres no estado pós menopáusico, mas o perfil plasmático de lípidos e as razões lipídicas foram semelhantes entre os grupos. Pentosidina e AGE total no plasma foram positivamente correlacionados. A concentração plasmática de AGE totais foi semelhante entre os grupos, mas foi menor nos estágios avançados do câncer de mama (estágios III e IV) quando em comparação aos estágios iniciais (estágios I e II). Pentosidina plasmática foi semelhante entre os grupos controle e câncer de mama e entre os tipos moleculares e estágios da doença, e foi menor nos estágios avançado (estágios III e IV) quando em comparação ao estágio inicial (estágio I). A concentração de sAGER foi semelhante entre os grupos controle câncer de mama, tipos moleculares e estágios clínicos da doença. Os achados demonstram uma redução nas

concentrações plasmáticas de AGE nos estágios avançados do câncer de mama. São necessários mais estudos para validar o uso dos AGE como biomarcadores ou mediadores do câncer de mama e para estabelecer sua relevância clínica e utilidade no prognóstico, na orientação de decisões terapêuticas e acompanhamento clínico.

Palavras-chave: câncer de mama, produtos de glicação avançada, pentosidina, receptor solúvel de produtos de glicação avançada.

ABSTRACT

Advanced glycation products (AGE) are prevalent in several conditions associated with the genesis of breast cancer, and in the tumor microenvironment, favoring oxidative and inflammatory insult and disturbing lipid homeostasis. AGE is recognized by the receptor for AGE, AGER, which mediates signaling pathways associated with increased proliferative and invasive capacity of breast tumors. Soluble forms of AGER (sAGER) inhibit AGE signaling and are indicated as negative modulators of the chronic complications mediated by AGE. The objective of the present study was to evaluate in newly diagnosed women with invasive breast cancer: a) the association between the plasma concentration of AGE and isoforms of soluble AGER, with the prognosis of the disease according to its molecular classification and clinical stage. Female subjects, between 18 and 80 years of AGE, with a recent diagnosis of breast cancer, virgins of treatment, with molecular classification and clinical prognostic staging of tumor I to IV. Healthy women matched for AGE and body mass index were included as a control group. Concentrations of plasma AGE and pentosidine were determined by fluorimetry. sAGER was measured by ELISA, and glyoxalase 1 will be evaluated by enzymatic colorimetric method. The frequency of molecular types of breast cancer was luminal B (38.3%), luminal A (29%), HER2 (16.9%), and TN (15.8%). The initial stages of the disease (I and II) represented 69% and the advanced ones (stages III and IV), 31% of the sample. Plasma lipid profile and lipid ratios were similar between the control and breast cancer groups. The plasma concentration of total AGE was similar between the control and breast cancer groups, but it was lower in the advanced stages of the disease (III and IV) compared to the initial stages (I and II). Plasma pentosidine was similar between groups and between molecular types and stages of breast cancer but was lower in the advanced stages of the disease (III and IV) compared to the initial stage (I). The concentration of sAGER was similar between breast cancer and control group, molecular types, and clinical stages of the disease. The findings demonstrate a reduction in plasma concentrations of AGE in the advanced stages of breast cancer. More studies are needed to validate the use of AGE as biomarkers or mediators of breast cancer and to establish their clinical relevance

and usefulness in prognosis, in guiding therapeutic decisions and clinical follow-up.

Keywords: breast cancer, advanced glycation end products, pentosidine, soluble advanced glycation end products receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Glicação e a formação dos produtos de glicação avançada

Figura 2 - Sinalização celular a partir da ligação AGE/AGER

Figura 3 - Isoformas solúveis do AGER.

Figura 4 - Correlação entre AGE total e pentosidina plasmáticos

Figura 5 – Concentração plasmática de AGE totais dos grupos Controle e Câncer de mama

Figura 6 - Concentração plasmática de pentosidina nos grupos Controle e Câncer de mama

Figura 7 - Concentração plasmática de AGER solúvel em mulheres do grupo Controle e Câncer de mama

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação molecular dos tumores de mama e prognóstico

Tabela 2 – Idade, dados antropométricos, dislipidêmicos e estado menopáusico

Tabela 3 – Perfil de lípides plasmáticos dos grupos controles e câncer de mama

Tabela 4 – Tipos histológicos e estadiamento do tumoral

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE - Produtos de glicação avançada

AGER - receptor para AGE

apoB - Apolipoproteína B

ATM – ATM serine/threonine kinase

BL1 - Basal-like 1

BL2 - Basal like 2

BRCA1 - Gene 1 do Câncer de mama

BRCA2 - Gene 2 do Câncer de mama

cAGER - Forma solúvel do AGER por clivagem proteolítica

CDI - Carcinoma ductal invasivo

CEL - Carboxietil-lisina

CHEK2 – Checkpoint kinase 2

CLI - Carcinoma lobular invasivo

CML - Carboximetil-lisina

CT - Colesterol Total

DJ-1 - Proteína deglicase 1

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidérmico

ERK1 – Extracellular signal-regulated kinase 1

ERK2 – Extracellular signal-regulated kinase 2

esAGER - Forma solúvel do AGER por Splicing

GAD - Gliceraldeído

GLOBOCAN - Observatório Global do Câncer

GO - Glioxal

HDL - Lipoproteína de densidade alta

HDLc - Colesterol na lipoproteína de densidade alta

HER2 - Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IC - Intervalo de confiança

IL-6 - Interleucina 6

JNK – c-Jun NH2-terminal kinase

LDL - Lipoproteína de densidade baixa

LDLc - Colesterol na lipoproteína de densidade baixa

MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógeno

MGO - Metilglioxal

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF-KB - Fator nuclear kappa B

OMS -Organização mundial da saúde

PALB2 – Partner and localizer of BRCA2

PARP - Poli ADP ribose polimerase

PCR - Proteína C reativa

PI3K - fosfatidilinositol-3-quinase

PTEN – Phosphatase and tensin homolog

RCS - reactive carbonyl species

RE - Receptor de estrógeno

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RP - Receptor de progesterona

RR - Risco relativo

sAGER - Forma solúvel do AGER

TG - Triglicérides

TN – Triplo-Negativo

TNF α - Fator de necrose tumoral

TNM - Tumor node metástases

TP53 – Tumor protein p53

VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular 1

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
SUMÁRIO.....	16
1. INTRODUÇÃO	18
1. 1 Produtos de Glicação Avançada.....	18
1. 1. 2 Produtos de Glicação Avançada e Seus Ligantes: Receptor para AGE	22
1. 1. 3 Produtos de Glicação Avançada e Seus Ligantes: Receptor Solúvel para AGE	23
1. 2 Câncer de Mama: Epidemiologia e Fatores de Risco	25
1. 3 Câncer de Mama: Classificação Molecular	26
1. 4 Câncer de Mama: Classificação Histológica	27
1. 5 Câncer de Mama: Estadiamento.....	28
1. 6 Câncer de Mama e os Produtos de Glicação Avançada.....	28
3. OBJETIVO.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4. 1 Casuística	33
4. 2 Classificação molecular do tumor	33
4. 3 Obtenção de amostras de plasma	34
4. 4 Determinação de AGE totais, pentosidina e AGER solúvel no plasma. 34	
4. 5 Análise estatística	34

5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	43
6.1 Conclusão	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
Anexos	59
Anexo I.....	59
Anexo II.....	70
Anexo III.....	74

1. INTRODUÇÃO

1. 1 Produtos de Glicação Avançada

A reação de glicação não enzimática ou reação de Maillard foi descrita, pela primeira vez, em 1912 por Louis Camille Maillard, em estudos sobre reações entre carboidratos e aminoácidos. A reação foi atribuída como responsável pelo escurecimento e odor característico durante a cocção prolongada de certos alimentos em altas temperaturas¹. Em 1920, vieram os primeiros estudos que elucidaram como os compostos intermediários instáveis eram formados durante a reação entre açúcares e proteínas, posteriormente, chamados de rearranjos de Amadori². Em meados da década de 50, foram publicados estudos que analisaram os efeitos biológicos deletérios causados pela glicação, como, a inativação de certos nutrientes³. Em 1964, identificaram-se subtipos de hemoglobina A modificadas por glicação⁴ e a associação entre o aumento destas frações modificadas da hemoglobina, especialmente a HbA1c, no diabetes mellitus foi evidenciada em 1968, em comparação ao sangue de indivíduos saudáveis⁵.

A reação de glicação inicia-se com a adição de um açúcar redutor (glicose, por exemplo), a uma amina primária formando uma carbinolamina intermediária que, por sua vez, sofre desidratação, produzindo uma base de Schiff instável. Esta sofre o chamado rearranjo de Amadori, levando a compostos mais estáveis, os produtos de Amadori, cuja característica principal consiste na geração da função amino-carbonila nos açúcares. A frutossamina e a hemoglobina glicada são exemplos de produtos de Amadori. Estes intermediários podem sofrer enolização, que pode ser seguida por uma série de reações de desidratação e hidrólise formando espécies carbonílicas altamente reativas (do inglês, *reactive carbonyl species*; RCS), que por sua vez associadas a um grupo amina acessível, dão origem aos AGE.

A formação dos AGE não depende apenas de glicose, podendo também ser gerada por uma via de estresse carbonílico, na qual, por meio de

oxidação dos açúcares e/ou lipídeos, formam-se compostos dicarbonílicos, como por exemplo glioxal (GO) e metilglioxal (MGO). Isto ocorre em associação à resposta inflamatória mediada por neutrófilos e/ou monócitos/macrófagos, ativando enzimas, como NADPH oxidase e mieloperoxidase que geram glicolaldeído (GAD). Além disso, a oxidação de certos aminoácidos, ácidos graxos poli-insaturados e corpos cetônicos gera oxoaldeídos e a rápida formação de AGE⁶⁻⁹ (**Figura 1**). Na doença renal, devido à falha na destoxificação de intermediários reativos e ao aumento do estresse oxidativo, também prevalece a formação dos AGE¹⁰.

Intracelularmente, os AGE são formados por meio de intermediários da via glicolítica, em especial pela geração de MGO, a partir de gliceraldeído 3-fosfato. O maior fluxo de glicose pela via glicolítica - observado na hiperglicemia e na convergência metabólica, que comumente ocorre em células tumorais - favorece a geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. O aumento do insulto oxidativo dispara respostas adaptativas, como o aumento da atividade da poli ADP ribose polimerase (PARP), enzima que medeia a correção da quebra em fita única da molécula de DNA, por garantir o acesso de enzimas específicas de reparo⁶⁻⁹. A PARP também promove modificação pós-traducional da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase por poli-ADP-ribosilação, comprometendo sua atividade e o fluxo na via glicolítica. Isto leva à geração de MGO e rápida geração de AGE, os quais exacerbam o insulto oxidativo, criando um círculo vicioso de geração de AGE no meio intracelular, inflamação e genotoxicidade¹¹.

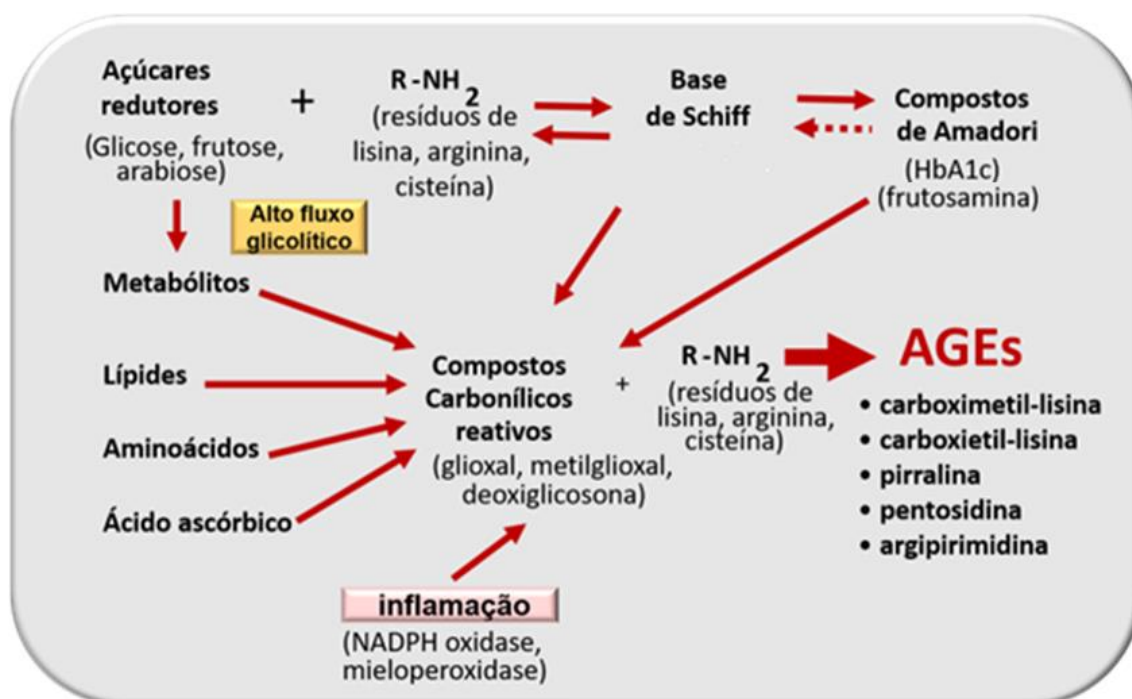


Figura 1. Glicação e a formação dos produtos de glicação avançada (AGE).

A reação de glicação caracteriza-se pela ligação covalente não enzimática entre grupos carbonílicos de açúcares redutores e grupos amino de aminoácidos livres ou seus resíduos em peptídeos, amino fosfolípidos ou ácidos nucleicos, com formação da base de Schiff e do composto de Amadori. Em seu estágio intermediário, a reação gera compostos carbonílicos reativos (glioal metilglioal, deoxiglicosona), capazes de atacar outros grupos amino, levando finalmente à formação dos produtos da glicação avançada (AGE). Além dos açúcares redutores, o alto fluxo na via glicolítica, produtos da oxidação de lípidos, aminoácidos, ácido ascórbico e produtos da reação inflamatória, podem dar origem aos compostos carbonílicos reativos. Carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, pirralina, pentosidina e argipirimidina são exemplos de AGE mais prevalentes no organismo humano⁹.

O GO e o MGO são destoxificados pelo sistema da glioalase - glioalase 1 e 2 - presente no citosol de todas as células, com a geração de S-D-lactosil-glutationa e D-lactato¹². A atividade destas enzimas é determinante para os efeitos tóxicos destes oxoaldeídos, principalmente, em células com elevada demanda glicolítica^{8, 12}. Estudos *in vitro*, conduzidos no final da década de 80, demonstram que em hemácias, na presença de elevadas concentrações de glicose, há aumento da expressão do sistema glioalase, o que torna estas células mais resistentes aos efeitos da hiperglicemia¹³.

Os AGE são estruturas muito heterogêneas o que dificulta sua exata mensuração. Alguns formam ligações cruzadas (*crosslinks*) entre proteínas¹⁴. A determinação de AGE em amostras biológicas, como plasma e urina, apresentou grande avanço no final da década de 90¹⁵. Os principais métodos incluem a determinação de AGE e pentosidina por fluorimetria, a determinação de autofluorescência da pele e métodos mais específicos como aqueles baseados em anticorpos específicos (ELISA e imunoblot) e espectrometria de massas. As técnicas baseadas em fluorescência aproveitam-se da capacidade de certos AGE em emitirem fluorescência embora não contemplem a medição de AGE não fluorescentes e possam, no caso da autofluorescência da pele, sofrer interferência de fatores como a cor da pele. No entanto, evidencia-se uma boa correlação de AGE fluorescentes na pele com a concentração tecidual de AGE¹⁶. Os métodos imunológicos são capazes de detectar, em geral, espécie única ou poucas espécies de AGE. De outro lado, o padrão-ouro – espectrometria de massas – é um método caro, trabalhoso e que requer mão-de-obra extremamente especializada.

A albumina é uma das proteínas mais suscetíveis à glicação, devido à sua elevada concentração na circulação e à presença de grande número de resíduos de lisina e arginina em sua cadeia polipeptídica. Durante a reação, a albumina perde sua estrutura secundária helicoidal o que afeta suas propriedades biológicas. Em indivíduos saudáveis, cerca de 10% de seu total circulante encontra-se na forma glicada, e essas concentrações aumentam em situações de hiperglicemia¹⁷.

Fontes exógenas de AGE incluem alimentos ricos em gordura e carboidratos, preparados em altas temperaturas por longos períodos, bem como o tabaco. Os AGE exógenos são absorvidos e transportados na circulação em associação à albumina e lipoproteínas. O consumo de alimentos ricos em AGE está associado a complicações metabólicas, aumentando o risco de desenvolvimento de complicações micro e macro vasculares no diabetes mellitus¹⁷. A função renal desempenha um papel importante na eliminação desses compostos, ajudando a reduzir o acúmulo de AGE no corpo¹⁸.

A formação dos AGE, juntamente com o estresse oxidativo e fatores epigenéticos, constituem a base fisiopatológica das complicações associadas ao envelhecimento, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas, câncer, entre outras¹⁹.

1. 1. 2 Produtos de Glicação Avançada e Seus Ligantes: Receptor para AGE

Os produtos de glicação avançada não apenas afetam a estrutura primária das proteínas, o que pode levar à mudança de sua função, mas também alteram os componentes da matriz extracelular. Nas células, interagem, principalmente com o receptor para AGE (AGER). O AGER foi descrito no início da década de 90, como uma proteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas que se encontra expressa em células do sistema imunológico. Apresenta domínios extracelulares, sendo um tipo V (parte que envolve a ligação com o ligante) e dois do tipo C; apresenta também um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática envolvida com a sinalização celular²⁰.

O AGER está presente em diferentes tipos celulares, como monócitos/macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, musculares lisas e neuronais. A interação dos AGE com o AGER dá início à sinalização que culmina na ativação de proteínas cinases ativada por mitógeno (MAPK), como a ERK, JNK, AKT, e a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) que conduzem à ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-KB). Este favorece a transcrição de genes inflamatórios que codificam para citocinas, fatores de crescimento (fator de necrose tumoral alfa – TNF- α ; interleucina 6 - IL-6; fator 24 de crescimento endotelial vascular - VEGF), moléculas de adesão (molécula de adesão celular vascular 1 – VCAM-1), e proteína C reativa (PCR). O aumento da expressão de *AGER*, é criado por retroalimentação positiva, por meio da ativação do NF-KB, no qual eleva-se a resposta inflamatória e a própria expressão do receptor de AGE. Ainda, a ativação do eixo AGE-AGER desencadeia aumento do estresse oxidativo intracelular e a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da ativação do complexo NADPH oxidase (**Figura 2**). Devido ao fato de o AGER ser um receptor multiligante, a interação do eixo AGE-AGER ativa vias relacionadas à inflamação e estresse oxidativo, tendo sido evidenciada sua

participação em condições patológicas como aterosclerose, artrite, síndrome metabólica, acidente vascular cerebral, neuro degeneração e câncer ^{8, 21}.

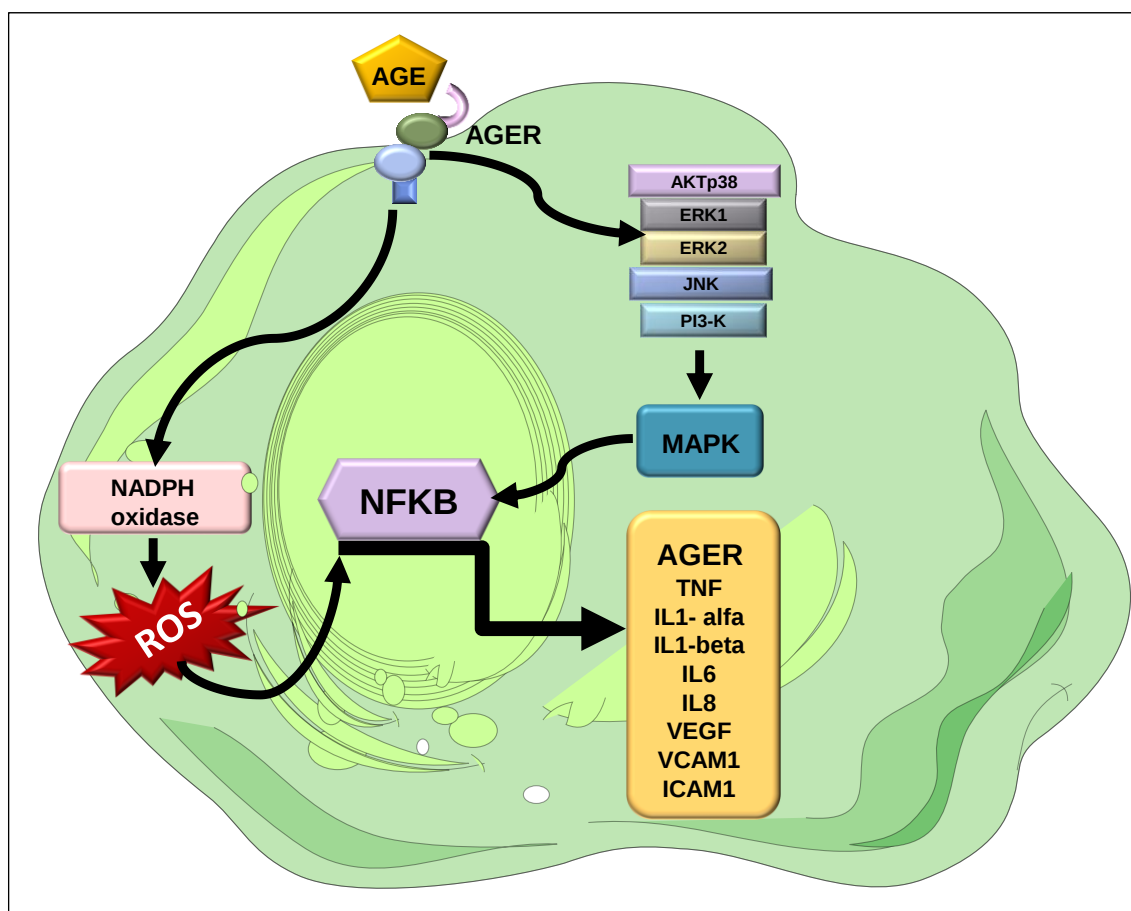


Figura 2. Sinalização celular a partir da ligação AGE/AGER. A interação de AGE com AGER leva ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente pelo sistema NADPH oxidase, o que culmina na ativação do fator nuclear NF-κB. Além disso, a ativação de proteínas cinases ativada por mitógeno (MAPK), como a ERK1 / 2, a JNK, a AKT, e a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) também convergem para a ativação NF-κB, com consequente transcrição de genes inflamatórios que codificam citocinas, molécula de adesão, fatores de crescimento e o AGER^{8, 21}.

1. 1. 3 Produtos de Glicação Avançada e Seus Ligantes: Receptor Solúvel para AGE

Isoformas do AGER têm sido descritas, em particular a forma solúvel encontrada no plasma, denominada de AGER solúvel (sAGER). Os sAGER são derivados da clivagem proteolítica do receptor na superfície celular ou de *splicing* alternativo. A proteólise da AGER ocorre constitutivamente e é estimulada pela ativação da PCK dependente de cálcio²². Existem duas isoformas de sAGER:

esAGER e cAGER. O primeiro é gerado pelo *splicing* alternativo do exon 9 do gene *AGER* e o último é gerado através de clivagem proteolítica por metaloproteases. Entre as isoformas solúveis, a mais predominante no plasma humano é a clivagem proteolítica (cAGER)²³. Por manterem sua habilidade de ligação aos AGE, embora desprovidos de capacidade de transdução de sinal intracelular, os sAGER se antagonizam às ações deletérias do AGER e são considerados receptores *decoy* (**Figura 3**). Neste sentido, embora não haja consenso, diversos estudos demonstram uma correlação negativa entre a concentração circulante de sAGER e as complicações crônicas do diabetes mellitus e outras doenças crônicas não transmissíveis²⁴⁻²⁸.

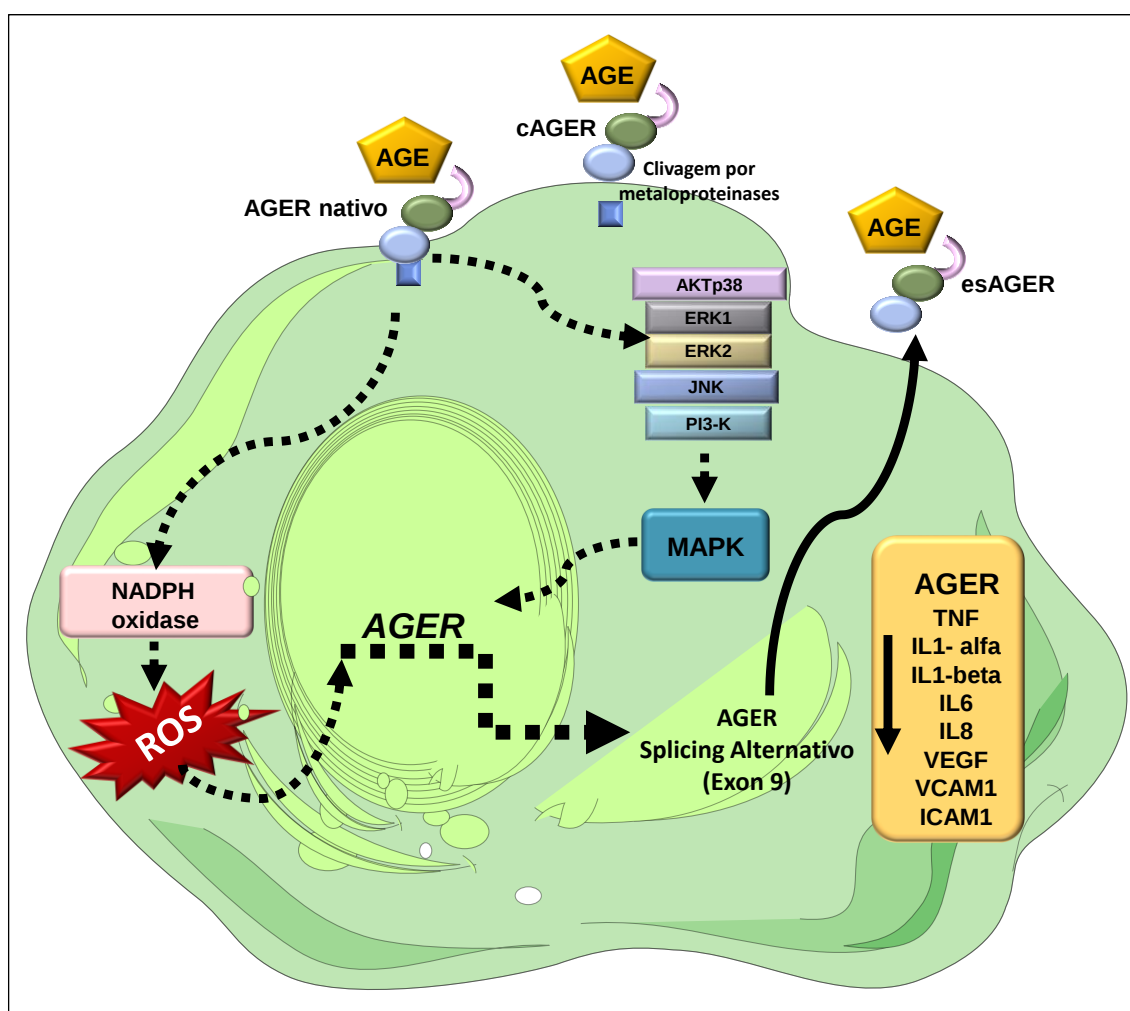


Figura 3. Isoformas solúveis do AGER. A geração de esAGER pode ocorrer por *splicing* alternativo do exon 9 do gene *AGER* ou por meio da clivagem proteolítica do AGER nativo por metaloproteases de superfície celular, formando cAGER. Embora sejam capazes de se ligar aos AGE, os sAGER

solúveis não promovem transdução de sinal intracelular, minimizando os efeitos deletérios da sinalização AGE-AGER²⁴⁻²⁸.

Outros receptores também se ligam aos AGE, em particular os receptores de AGE (R1, R2 e R3 ou galectina) os quais antagonizam a via do AGER e promovem a expressão de genes anti-inflamatórios e antioxidantes²⁸⁻³⁰.

1. 2 Câncer de Mama: Epidemiologia e Fatores de Risco

O câncer de mama é uma doença heterogênea, o que pode ser caracterizado pela diversidade em manifestações clínicas e morfológicas. O aumento da idade e o sexo feminino são fatores de risco estabelecidos para o câncer de mama. Sua manifestação é pouco comum em mulheres abaixo dos 40 anos, mas aumenta significativamente com a idade³¹. Segundo GLOBOCAN em parceria com a agência internacional de pesquisa em cânceres (IARC) o câncer de mama em mulheres é a forma mais comum de câncer no mundo, superando o diagnóstico do câncer de pulmão no ano de 2020. Uma em cada quatro mulheres tem como a causa de morte o câncer de mama, e entre os casos de câncer é responsável de uma a cada seis mortes³². Apenas cerca de 1% de todos os cânceres de mama ocorre em homens, sendo geralmente diagnosticado em estágios mais avançados quando comparado à população feminina³³⁻³⁴.

O antecedente pessoal de certas patologias mamárias também se correlaciona com o maior risco de desenvolver câncer de mama. Em um estudo com 674 amostras de biópsias benignas provenientes de 120 casos que, subsequentemente, desenvolveram câncer de mama e 382 controles (pareados por idade e data da biópsia), em um período de até 20 anos de seguimento (média de 66,95 meses), houve confirmação de risco associado a certos tipos de lesões mamárias benignas. Hiperplasia lobular atípica foi o mais significativo fator de risco para o câncer de mama, tendo apresentado risco relativo (RR) de 4,55 (intervalo de confiança [IC] 1,77-11,69). Para a hiperplasia ductal atípica, o RR foi 2,03 (IC 0,80-1,39)³⁵.

Mulheres que possuem dois ou mais parentes de primeiro grau com histórico prévio de câncer de mama têm um risco aumentado em até cinco vezes de desenvolver a doença. Além disso, a presença de um familiar de primeiro grau com câncer de ovário, especialmente se diagnosticado antes dos 50 anos, está associada a um maior risco de câncer de mama, o que pode indicar a presença de variantes patogênicas dos genes supressores de tumor BRCA1 (câncer de mama 1) ou BRCA2 (câncer de mama 2)³⁵⁻³⁶. Por meio de Sequenciamento Genético de Nova Geração, outras variantes genéticas, diferentes dos tipos BRCA também são observadas nos casos de câncer de mama, em menor parte, como *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN* e *TP53*³⁷.

Estudos epidemiológicos evidenciaram uma correlação positiva entre câncer de mama após a menopausa com obesidade, sedentarismo e consumo de álcool, fatores que, se modificados, podem provavelmente prevenir o aparecimento do câncer de mama³⁸.

O prognóstico do carcinoma é influenciado por uma série de fatores que, quando combinados, permitem um tratamento mais direcionado e um melhor prognóstico. Esses fatores incluem o tamanho do tumor, o grau de diferenciação histológica, a presença de comprometimento axilar e invasão linfovascular³⁹. No entanto, é importante notar que há casos em que tumores apresentam características patológicas semelhantes, mas comportamentos diferentes⁴⁰.

1. 3 Câncer de Mama: Classificação Molecular

Os tumores de mama podem ser classificados em subtipos clínico-patológicos, que permitem avaliar o prognóstico e resposta terapêutica. Essa classificação é baseada na presença ou ausência de receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (PR) e na expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER2). Os subtipos são divididos em Luminais, HER2 e triplo-negativo (TN). O tipo luminal A é RE e/ou RP positivo, HER-2 negativo e com Ki-67 baixo (índice de proliferação celular <14%); luminal B HER-2 negativo: RE e/ou RP positivo, HER-2 negativo e com Ki-67 alto (≥14%); luminal B HER-2 positivo: RE e/ou RP positivos e HER-2 positivo; HER-2 altamente expresso (não luminal): RE e RP negativo e HER-2 positivo; triplo-

negativo: ausência de expressão de RE, RP e HER2 (**tabela 1**). O tipo TN ainda pode ser subdividido nos tipos *basal-like 1* (BL1), *basal-like 2* (BL2), imunomodulador, mesenquimal, mesenquimal-tronco e luminal receptor de androgênio. De acordo com Consenso St. Gallen (2011), esta classificação teve grande importância na indicação do tratamento sistêmico do câncer de mama. De maneira geral, ficou melhor estabelecida a importância do tratamento com hormonioterapia para os tumores luminais, quimioterapia e anticorpo monoclonal anti-HER2 (trastuzumabe) para os tumores que expressam HER2 e quimioterapia para os TN ^{37, 41-42}.

Tabela 1. - Classificação molecular dos tumores de mama e prognóstico

Luminal A		Luminal B		HER2		TN
RE + e/ou RP +		RE + e/ou RP +		RE -		RE - RP -
HER 2 -		HER 2 +				HER 2 -
Subtipo mais comum		Semelhante ao Luminal A		Risco maior <40 anos		Maior risco <40 anos
Menos agressivo		Mais frequentemente RE+/RP-		Menos comum, altamente agressivo		Citoqueratina 5/6 + e/ou EGFR + Agressivo
Bom prognóstico		Prognóstico pior que o Luminal A		Melhora do prognóstico com terapias-alvo		Alta taxa mitótica Pior prognóstico

1. 4 Câncer de Mama: Classificação Histológica

O câncer de mama é classificado em diferentes tipos histopatológicos com base em suas características. A quarta edição da Classificação Internacional de Tumores da Mama da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicada em 2012, aborda a classificação histopatológica dos tumores de mama. O tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal invasivo (CDI), que representa cerca de 70-80% dos casos. O CDI origina-se nos ductos mamários e invade o tecido circundante. O carcinoma lobular invasivo (CLI) representa cerca de 10-15% dos casos e se origina nas células das glândulas mamárias. O tumor pode

ser classificado de acordo com o grau de diferenciação celular e a expressão de receptores hormonais e HER2. Outros tipos de tumores menos comuns incluem o Carcinoma Mucinoso, carcinoma medular e carcinoma Metaplásico, cerca de 1-3% dos casos⁴²⁻⁴⁴.

1. 5 Câncer de Mama: Estadiamento

Avaliar o estágio do câncer de mama é essencial para prognosticar a neoplasia, e o grau é determinado pela análise microscópica de amostras histopatológicas. O sistema TNM (*Tumor Node Metastasis*), desenvolvido pelo *American College of Surgeons*, é uma das maneiras de classificar o grau do carcinoma e leva em conta o tamanho do tumor primário (T), a presença de metástases nos linfonodos regionais (N) e a existência de metástases à distância (M). Existem quatro estágios (I-IV), sendo o estágio I o mais inicial e o IV o mais avançado, representando o câncer localizado e o câncer metastático, respectivamente⁴⁵.

1. 6 Câncer de Mama e os Produtos de Glicação Avançada

Uma característica atribuída as células cancerosas é a glicólise aeróbia, que propicia alto fluxo glicolítico e geração de lactato, com manutenção de fosforilação oxidativa em taxa constante. Esta propriedade relativa ao metabolismo energético foi proposta por Otto Warburg, que observou que, mesmo na presença de oxigênio, as células cancerosas reprogramavam seu metabolismo da glicose, o que foi denominado glicólise aeróbica ou efeito Warburg. Este processo foi proposto como favorável à sobrevivência celular, propiciando substratos para a proliferação, resistência à hipóxia e atenuação de apoptose⁴⁶. Em decorrência, subprodutos glicolíticos altamente reativos como os dicarbonilas GO e MGO são formados em quantidades substanciais. Isso é reforçado ainda mais pelo estresse oxidativo ⁴⁷. O sistema glioxalase que favorece a metabolização de MGO em D-lactato é apontado como possível preditor de complicações dos AGE; a exacerbada expressão de glioxalase 1 reduz complicações⁴⁷⁻⁴⁹. Além disso, o sistema das redutases, que inclui a aldeído redutase e a carbonil redutase, aldose redutase, bem como as enzimas

frutosamina-3-cinase e frutosamina oxidase também participam da destoxificação de intermediários da reação de glicação, embora a modulação funcional destas enzimas e a interferência de variantes genéticas seja pouco conhecida, especialmente no câncer ⁵⁰.

A presença dos AGE em vários tumores humanos, incluindo câncer de mama, foi demonstrada utilizando anticorpos específicos⁴⁸. Tesarova et al. ⁵¹ (2007) evidenciaram que indivíduos portadores de câncer de mama, após tratamento cirúrgico local e quimioterapia adjuvante, tiveram até mesmo no estágio inicial I (doença localizada na mama, com tumor menor que 2 cm) concentração plasmática aumentada de AGE. Indivíduos nos estágios clínicos III-IV tinham concentração de AGE maiores do que os indivíduos nos estágios clínicos I-II.

Um estudo conduzido por Walter et al.⁵² (2018) demonstrou que as amostras de tecido tumoral de mulheres com câncer de mama, apresentaram maior conteúdo de AGE, como a carboximetil-lisina (CML) e a carboxietil-lisina (CEL), em comparação com tecidos saudáveis. Além disso, foi observada uma tendência para valores mais elevados de AGE em tumores com receptor de estrógeno positivo, indicando resistência à terapia com tamoxifeno. O aumento do conteúdo de CML foi correlacionado com pior resposta à quimioterapia em 213 amostras de carcinoma de mama, de acordo com um estudo realizado por Nass et al.⁵³ (2016).

Os AGE exercem efeitos pró-tumorgênicos e aumentam a proliferação, migração e capacidade invasiva em células de câncer de mama triplo-negativo, por meio da ativação das vias ERK e NF-KB⁵⁴⁻⁵⁵. Um efeito hormético, que pode ser descrito como uma resposta adaptativa a um estímulo moderado tem sido demonstrado para o MGO, caracterizado por estimulação do crescimento tumoral *in vivo*, e inibição do crescimento tumoral em, respectivamente, baixas e altas doses⁵⁶⁻⁵⁷.

A glicação de histonas e da molécula de DNA tem sido identificada em diferentes tipos de tumores, resultando em modificações na expressão de genes que estão geralmente relacionados a um prognóstico desfavorável. A proteína DJ-1 desempenha um papel nessas alterações, estando associada tanto aos processos de glicação de histonas e MGO e o estresse oxidativo. Além de sua

relação com a doença de Parkinson, a DJ-1 também tem sido associada a outros tipos de câncer e, especificamente, foi observada uma associação positiva entre DJ-1 e câncer de mama⁵⁸⁻⁵⁹.

Em um estudo realizado com 116 indivíduos com câncer de mama, seguidos por uma média de 10,3 anos, observou-se que polimorfismos do gene *AGER*, que codifica o AGER, relacionaram-se, positivamente, com a taxa de mortalidade, sugerindo um papel do eixo AGE/AGER não apenas no desenvolvimento do câncer, mas também em seu prognóstico. Neste aspecto, o bloqueio do AGER foi capaz de reduzir a taxa de crescimento tumoral e seu potencial metastático⁶⁰.

Um fator altamente responsável pela mortalidade de muitos indivíduos portadores do câncer é a metástase. Entre os diferentes tipos de câncer de mama, o triplo-negativo tem sido associado ao pior prognóstico e menor sobrevida. NANKALIA et al.⁶¹ (2016), demonstraram que o *AGER* é expresso em um conjunto agressivo de amostras de câncer de mama triplo- negativo, tecido canceroso metastático e linfonodo positivo. Além disso, no mesmo estudo, a expressão de *AGER* foi aumentada nos tecidos tumorais de mama em estágio avançado, em comparação com os tecidos tumorais de baixo estágio. Tal fato corrobora o achado de alta expressão de *AGER* observada em câncer de mama com linfonodos positivos e metastáticos por NASSER et al.⁶² (2015).

KWAK T et al.⁶³ (2017), demonstraram, em modelo animal, os efeitos do bloqueio do AGER em células de câncer de mama, reduzindo a taxa de crescimento tumoral, a angiogênese, o recrutamento de células inflamatórias e seu potencial metastático.

Um estudo populacional geral denominado CARLA (*Cardiovascular Disease, Living and Aging in Halle*) com cerca de 1760 participantes, com idades entre 45 e 83 anos, demonstrou que não houve associação das concentrações de AGE e seu receptor solúvel com a mortalidade⁶⁴. Por outro lado, Tesarová P, et al.⁶⁵ (2007), demonstrou em seu estudo com 120 indivíduos portadores de câncer de mama, após pelo menos seis meses de tratamento adjuvante com quimioterapia, que as concentrações desse receptor foram menores nos pacientes com câncer em comparação aos controles.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos evidenciam aumento da concentração dos AGE na circulação e no leito tumoral de indivíduos portadores de câncer de mama. Entretanto, os AGE encontram-se aumentados em várias condições metabólicas que contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama, incluindo-se diabetes mellitus, obesidade e resistência insulínica. Os tumores malignos de mama podem expressar ou não receptores para estrogênio e/ou progesterona, além do receptor ERB2 (HER-2), com implicações prognósticas e terapêuticas reconhecidas para cada tipo molecular. A evolução clínica das neoplasias mamárias tende a seguir a história natural de cada tipo molecular, embora os fatores prognósticos clássicos nem sempre sejam suficientes para compreender o comportamento de cada caso, como as recaídas. Nossa hipótese é de que os AGE plasmáticos e seu sistemas contra regulatório, AGER solúvel, possam diferir entre indivíduos com câncer de mama e controles e entre os diferentes tipos moleculares e estágios clínicos do tumor. A determinação de AGE totais e pentosidina por fluorimetria associa-se positivamente com a concentração tecidual de AGE e com complicações em longo prazo promovidas pelos AGE. Além disso, embora seja uma técnica menos sensível em comparação a outras de medição dos AGE, é barata e de rápida realização, podendo ser útil na determinação dos AGE como eventuais indicadores de evolução clínica e prognóstico terapêutico do câncer de mama. Até o momento, não existem dados da literatura que contemplem análises de AGE em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama e isentas de tratamento, e os resultados que evidenciam variação de AGE no câncer podem ser influenciados pela presença de comorbidades e pelas terapias adjuvantes e neoadjuvantes.

3. OBJETIVO

Avaliar em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama, estágios I a IV, isentas de tratamento, a concentração plasmática de AGE totais, pentosidina e sAGER em comparação a mulheres controles e entre os tipos moleculares e estágios clínicos da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1 Casuística

Estudo de coorte transversal, onde foram inclusos 201 indivíduos do sexo feminino, entre 18 e 80 anos de idade, com diagnóstico recente de câncer de mama, virgens de tratamento, com quaisquer estadiamentos do tumor e com classificação molecular estabelecida, e 157 mulheres saudáveis na mesma faixa etária, pareadas por idade e índice de massa corporal foram incluídas como grupo controle. Não foram incluídas gestantes, mulheres em uso de terapias hormonais assim como o uso de anticoncepcionais, portadoras de diabetes mellitus, doença renal crônica (taxa de filtração glomerular $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$), doenças autoimunes e imunossupressoras, tabagistas, etilistas, com história prévia de câncer ou doença *in situ*. Mulheres portadoras do câncer de mama foram recrutadas no Hospital Pérola Byington, enquanto as mulheres saudáveis, 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 pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho (#3.139.460; fevereiro de 2019), Centro de Referência da Saúde da Mulher (Hospital Pérola Byington; #3.225.220; março de 2019) e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (#3.317.909, março de 2019) (anexo I - III). Após exclusão das voluntárias por não atenderem aos critérios de elegibilidade, 150 mulheres permaneceram no grupo controle e 186 no grupo câncer de mama. O desenho do estudo seguiu o *checklist* STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) (anexo II).

4. 2 Classificação molecular do tumor

A classificação molecular do tumor dos indivíduos incluídos no estudo foi obtida do prontuário médico, junto ao Hospital Pérola Byington. As análises dos subtipos moleculares foram realizadas após remoção cirúrgica do tecido tumoral

por imuno-histoquímica de acordo com parâmetros do *American College of Pathologists*⁴²⁻⁴⁵.

4. 3 Obtenção de amostras de plasma

De ambos os grupos, foram 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 foi, imediatamente, obtido por centrifugação a 4°C, 20 min, 3000 rpm. As amostras de plasma total foram mantidas a -80°C. Os lípides plasmáticos (colesterol total, HDL colesterol e triglicérides), a glicemia, ureia, creatinina, enzimas hepáticas (alanina e aspartato aminotransferase) foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos (Roche do Brasil).

4. 4 Determinação de AGE totais, pentosidina e AGER solúvel no plasma.

Os conteúdos plasmáticos de AGE totais e pentosidina foram determinados por fluorimetria (Synergy HT Leitora de microplacas multimodo, SpectraMax M5). As amostras foram excitadas em um comprimento de onda de 370 nm e a fluorescência emitida a 440 nm e 378 nm, respectivamente, para AGE totais e pentosidina. O conteúdo plasmático de AGER solúvel (sAGER) foi determinado por ELISA (R&D System, Minneapolis, Minnesota, EUA).

4. 5 Análise estatística

Os dados foram tabulados e organizados em dois grupos: Controle, composto por mulheres saudáveis e grupo câncer de mama. Os dados foram categorizados em; idade, índice de massa corporal e estado menopáusico para ambos os grupos. O grupo câncer de mama foi subcategorizado de acordo com a classificação molecular do tumor ou estadiamento clínico da doença. A normalidade das amostras foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e o teste de Grubbs foi aplicado para identificar possíveis outliers. Os dados não paramétricos, representados pela mediana e quartis inferior e superior, foram

comparados por meio do teste de Mann-Whitney para duas amostras e do teste de Kruskal-Wallis, com o pós-teste de Dunn, para comparações envolvendo mais de duas amostras. O pós-teste de Sidak foi utilizado para ajustar a idade como covariável de desfecho. As frequências foram comparadas pelo teste qui-quadrado. As análises de correlação foram feitas pelo teste de Spearman. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os softwares IBM® SPSS Statistics (versão 20.0), GraphPad Prisma (versão 8.0.2) e Microsoft® Home and Student 2019, Excel para tabulação e análise dos dados.

5. RESULTADOS

A mediana da idade e a frequência de mulheres no estado pós-menopausa foi maior no grupo câncer em relação ao grupo controle. O índice de massa corporal (IMC) foi semelhante entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Idade, dados antropométricos e estado menopáusico

	CONTROLE		CÂNCER DE MAMA		P
n	148		179		
Idade (anos)*	51 (38 – 59)		55 (48 – 63)		<0,001
IMC (kg/m ²)*	28 (25 – 31)		27 (24 – 31)		0,519
	n	%	n	%	
IMC ≥ 25 kg/m ²	108	72	119	64,3	
Estado menopáusico**					
Pré-menopausa	75	50,6	63	35,2	
Pós-menopausa	73	49,3	116	64,8	

*Valores em mediana e intervalos interquartílicos 25%-75%. **Valores apresentados em frequência e percentil.

O perfil de lípides plasmáticos (colesterol tota [CT]I; triglicérides [TG]; apolipoproteína B [apoB]; colesterol na lipoproteína de densidade alta [HDLc]; colesterol na lipoproteína de densidade muito baixa [VLDLc]; colesterol na lipoproteína de densidade baixa [LDLc]. TG/HDLc (indicadoras da presença de LDL pequenas e densas) foram semelhantes entre os grupos controle e câncer de mama (Tabela 3). Também não houve diferença entre os lípides plasmáticos e razões lipídicas quando comparados os tipos moleculares e estágios clínicos do câncer de mama (dados não mostrados).

Tabela 3 – Perfil de lípides plasmáticos dos grupos controles e câncer de mama

	CONTROLE	CÂNCER DE MAMA	P
n	148	179	
CT (mg/dL)	173 (153 - 202)	186 (158 - 209)	0,175
TG (mg/dL)	85 (59 - 119)	92 (68 - 116)	0,311
apoB (mg/dL)	110 (90 - 137)	107 (84 - 139)	0,462
HDLc (mg/dL)	43 (35 - 51)	42 (34 - 51)	0,648
LDLc (mg/dL)	113 (95 - 131)	116 (127 - 189)	0,434
não HDLc (mg/dL)	129 (110 - 157)	136 (113 - 164)	0,278
CT/apoB	1,5 (1,3 - 1,9)	1,7 (1,4 - 2,0)	0,182
TG/HDLc	1,9 (1,3 - 3,0)	2,2 (1,4 - 3,2)	0,307

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

Entre os tumores, o tipo ductal foi o mais prevalente, seguido do lobular, mucinoso e metaplásico (Tabela 4). Observou-se maior frequência do tipo molecular luminal B (37,9%), seguido do luminal A (28,4%), com frequência dos luminais agrupados de 66,3%. Os tipos HER2 e TN apresentaram frequência de, respectivamente, 17,3% e 16,2%. Em 1,6% dos casos não foi possível obter a classificação imuno-histoquímica das neoplasias. Em relação ao estágio clínico da doença, a maioria das mulheres foi categorizada com doença inicial (68,2%), incluindo os estágios I e II da doença. A doença avançada, caracterizada como estágios III e IV, foi responsável por 31,8% da amostra (Tabela 4).

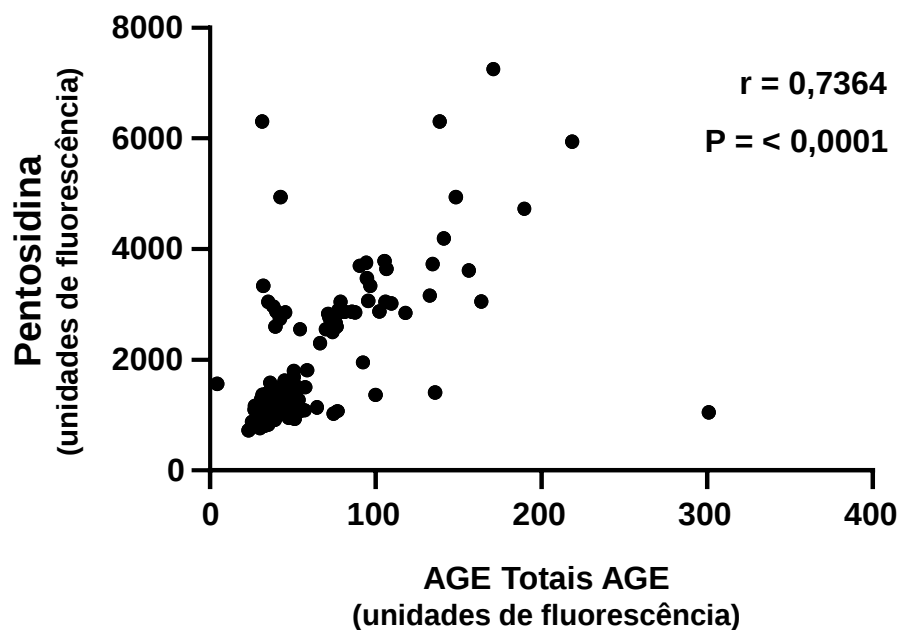
Tabela 4 – Tipos histológicos e estadiamento do tumoral

		N	%	% agrupado*
Tipo histológico	Ductal	158	88,3	
	Lobular	13	7,3	
	Mucinoso	7	3,9	
	Metaplásico	1	0,5	
Tipo molecular	Luminal A	51	28,4	66,3
	Luminal B	68	37,9	
	HER2	31	17,3	33,5
	TN	29	16,2	
Estágio clínico	I	56	31,2	68,2
	II	66	36,8	
	III	38	21,2	31,8
	IV	19	10,6	

* Agrupados refere-se: Luminais (luminal A + luminal B); doença inicial (estágio I + estágio II); doença avançada (estágio III + estágio IV); TN = triplo-negativo.

As concentrações plasmáticas de AGE totais e pentosidina foram determinadas por fluorimetria e os resultados corrigidos por idade. Observou-se correlação positiva entre AGE total e pentosidina no plasma (Figura 4).

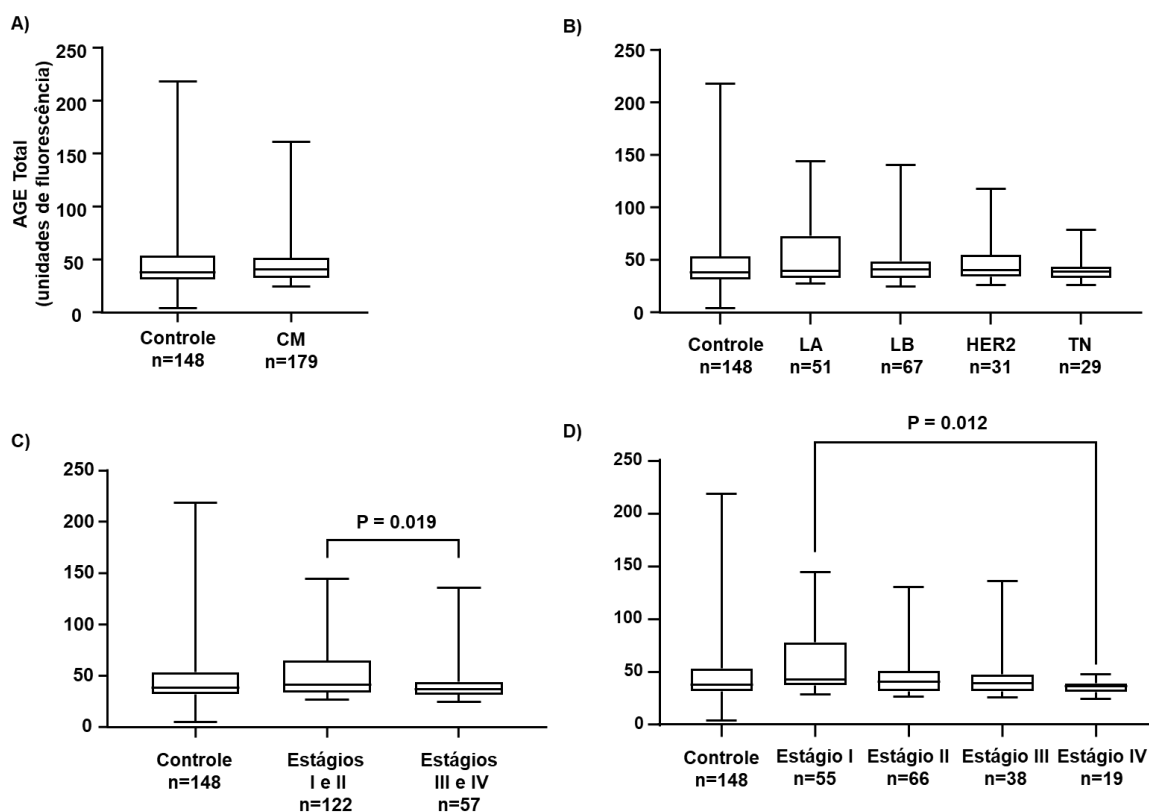
Figura 4 - Correlação entre AGE total e pentosidina plasmáticos



A concentração plasmática de AGE totais e pentosidina foram determinadas por fluorimetria (excitação a 370 nm e emissão a 440 nm e 378nm, respectivamente). A correlação foi feita pelo teste de Sperman.

Não houve diferença na concentração de AGE totais entre os grupos controle e câncer de mama e, também, quando comparados os tipos moleculares de câncer de mama (Figura 5, painéis A e B). Entretanto, houve menor concentração de AGE totais nos estágios avançados da doença (estágios III e IV agrupados) em comparação aos estágios iniciais (I e II agrupados) (Figura 5, painel C) e entre o estágio IV, analisados isoladamente, em comparação ao estágio I (Figura 5, painel D).

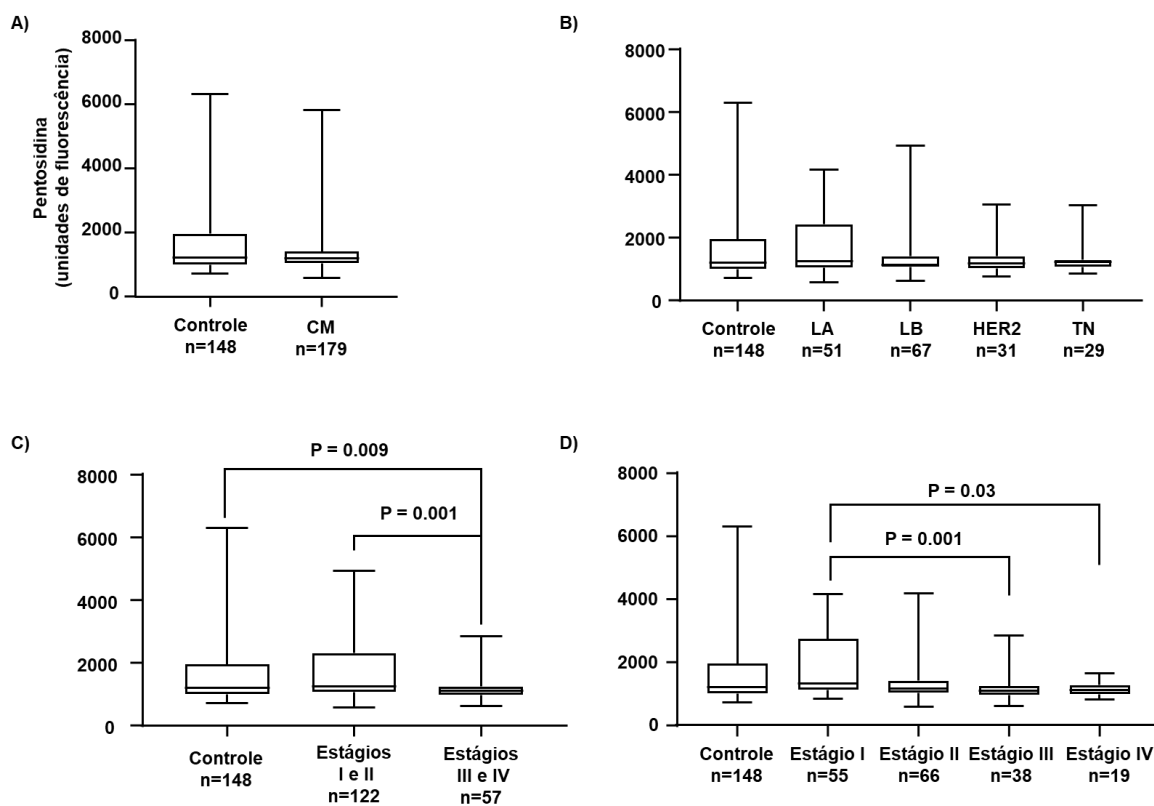
Figura 5 – Concentração plasmática de AGE totais dos grupos Controle e Câncer de mama



A concentração plasmática de AGE totais foi determinada por fluorimetria (excitação a 370 nm e emissão a 440 nm). As comparações foram feitas pelo teste de *Mann-Whitney* (Painel A: Controle vs câncer de mama) e para múltiplas comparações (painéis B a D, tipos moleculares e estágios clínicos da doença), pelo teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*. Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para identificação de *outliers* e corrigidos por idade pelo teste de Sidak.

Resultados semelhantes foram encontrados quanto as concentrações de Pentosidina entre os grupos controle e câncer de mama, assim como no AGE totais, (Figura 6, painéis A e B). Entretanto, houve menor concentração de Pentosidina nos estágios avançados da doença (estágios III e IV agrupados) em comparação ao controle e aos estágios iniciais (I e II agrupados) (Figura 6, painel C). Quando observados isoladamente, os estágios III e IV tiveram menor concentração que o estágio I (Figura 6, painel D).

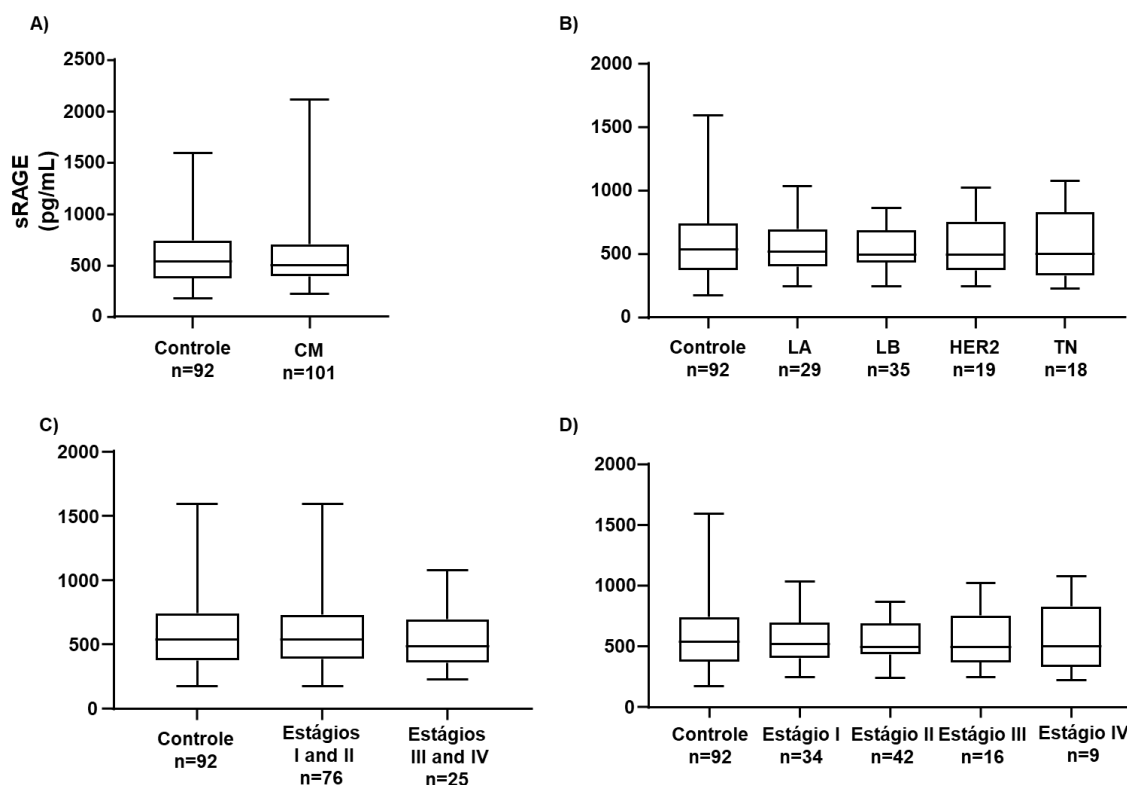
Figura 6 - Concentração plasmática de pentosidina nos grupos Controle e Câncer de mama



A concentração plasmática de pentosidina total foi determinada por fluorimetria (excitação a 370 nm e emissão a 378 nm). As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney Painel A: controle vs câncer de mama) e para múltiplas comparações (painéis B a D, tipos moleculares e estágios clínicos da doença), pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para identificação de *outliers* e corrigidos por idade pelo teste de Sidak.

A concentração sAGER não diferiu entre os grupos controle e câncer de mama, tampouco entre os tipos moleculares e estágios clínicos da doença (Figura 7, painéis A-D).

Figura 7 - Concentração plasmática de AGER solúvel em mulheres do grupo Controle e Câncer de mama.



A concentração plasmática de AGER solúvel (sAGER) foi determinada por ELISA. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney (Painel A: controle vs câncer de mama) e para múltiplas comparações (painéis B a D, tipos moleculares e estágios clínicos da doença), pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Os dados foram submetidos ao teste de Grubbs para identificação de *outliers* e corrigidos por idade pelo teste de Sidak.

6. DISCUSSÃO

Os AGE estão aumentados no leito tumoral e na circulação de indivíduos com câncer de mama e são prevalentes em várias condições que contribuem para o desenvolvimento do tumor⁶⁴. O presente estudo evidenciou que em mulheres com câncer de mama, sem tratamento prévio e sem comorbidades associadas à elevada geração de AGE, as concentrações de AGE totais e pentosidina no plasma 1) foram semelhantes às de mulheres controles pareadas; 2) foram menores em estágios clínicos avançados da doença (estágios III e IV) em comparação com doença localizada (estágios I e II) e 3) foram semelhantes entre os tipos moleculares da doença. No entanto, a concentração de sAGER, que antagoniza a sinalização de AGE e seus efeitos deletérios, foi semelhante entre mulheres com câncer de mama e controles e entre todos os estágios e tipos moleculares da doença.

As células tumorais reprogramam seu metabolismo, o que favorece seu crescimento, proliferação e sobrevivência em longo prazo, mesmo na presença de oxigênio. Este fenômeno, conhecido como glicólise aeróbica, envolve aumento da captação de glicose e conversão em lactato⁴⁶. Além de impulsionar a oncogênese, reconhece-se que este processo promove a maior geração de MGO e, conseqüentemente, a formação de AGE. Em tumores de mama, o MGO favorece a remodelagem de matriz extracelular e vias migratórias, contribuindo para disseminação metastática de células cancerosas, por meio da ativação da via MEK/ERK/SMAD⁶⁵. No soro de indivíduos com câncer de mama, foi identificada a modificação do DNA por MGO e 3-deoxyglucosona, além de várias proteínas modificadas por AGE⁶⁶.

Tumores sólidos acumulam grandes quantidades de lipídeos, graças à maior captação de lipoproteínas, em especial lipoproteínas de densidade baixa (LDL), e à maior síntese de colesterol por meio da atividade da enzima hidroximetilglutaril CoA⁶⁷⁻⁶⁸. Esteróis, em particular, o colesterol, são elementos essenciais à proliferação celular e seu acúmulo intracelular favorece a geração de óxidos de colesterol, como 27 hidroxicoesterol e 25 hidroxicoesterol. Estes, por meio da ativação do receptor X hepático (LXR) vinculam-se à transição

epitélio-mesenquimal e metástase⁶⁹. De outro lado, o acúmulo de lípidos favorece processos oxidativos e inflamatórios os quais, juntamente com a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, favorece a formação de oxoaldeídos, com rápida formação de AGE⁷⁰.

Carboximetil lisina e carboxietil lisina encontram-se mais elevadas no tecido tumoral mamário em comparação com o tecido saudável, especialmente na doença avançada. Os AGE estão positivamente associados à genotoxicidade, proliferação, migração e metástase no câncer de mama⁴⁹⁻⁵⁵, o que se vincula, em parte, ao seu papel na resistência ao tamoxifeno⁷¹. No entanto, na maioria dos estudos, as análises foram feitas em indivíduos com comorbidades relacionadas à maior prevalência dos AGE, como obesidade, resistência à insulina, diabetes mellitus e doença renal crônica ou na presença de terapia oncológicas^{61, 72-74}. Além disso, quando não pareados por idade, os resultados podem ser tendenciosos em relação à concentração tecidual e plasmática dos AGE.

Em uma coorte que seguiu 131 indivíduos com câncer de mama, a concentração plasmática de AGE, medida por ELISA, correlacionou-se com maior incidência de metástase. Importante salientar que o estudo incluiu mulheres com diabetes mellitus, sendo observada para elas evolução mais rápida para proliferação celular e invasão em comparação aquelas sem diabetes. Neste mesmo estudo, em modelo celular, evidenciou-se que os efeitos dos AGE são mediados pela ativação do eixo *AGER/Toll like receptor 4* e sinalização via fator de diferenciação mieloide (MyD88)⁷⁵. Em células de linhagem tumoral TN, a tumorigênese, invasão e migração foram induzidas pelas vias da ERK e NF-KB que favoreceu a expressão da metaloproteinases de matriz 9 (MMP-9) e gelatinase⁵⁴.

Mais de 20 diferentes tipos de AGE já foram identificados no sangue e em tecidos, bem como nos alimentos. Eles incluem AGE fluorescentes (principalmente, pentosidina, argipirimidina, dímero de metilglioxal-lisina, AGE-XI, vesperlysina A e vesperlysina C) e não fluorescentes (principalmente, carboximetil-lisina, carboxi etil-lisina e pirralina), capazes ou não de promover *crosslinking* de proteínas⁷⁶.

A fluorimetria é uma das técnicas utilizadas para medição de AGE fluorescentes (incluindo-se pentosidina, argipirimidina, entre outros) em amostras biológicas, como sangue, urina e tecidos, com a vantagem de ser rápida, fácil e de baixo custo. Embora seja menos sensível, em comparação com a técnica padrão-ouro, como espectrometria de massas, e não permitindo a diferenciação entre subespécies de AGE e AGE não fluorescentes, existe uma boa correlação entre as medidas de AGE por fluorimetria em relação a outras técnicas. O método de ELISA também é muito utilizado, embora possa apenas refletir uma única espécie particular de AGE, enquanto por imunoblot, a determinação específica limita-se a efetividade dos anticorpos⁷⁶. Evidencia-se uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de AGE medidas por fluorimetria e AGE teciduais, incluindo-se pele, retina e artérias e suas complicações relacionadas⁷⁷. Além disso, a determinação de AGE fluorescentes é apontada como técnica útil na avaliação de AGE circulantes e na monitorização da excreção de AGE em indivíduos com diabetes⁷⁸. A pentosidina, considerada como principal produto de glicoxidação, capaz de emitir fluorescência e promover *crosslinking*, é amplamente utilizada como medida do acúmulo total de AGE no plasma e tecidos⁷⁹. Desta forma a determinação de AGE fluorescentes no plasma pode ser uma indicação útil de suas concentrações em vários compartimentos com implicação em doenças crônicas⁷⁶.

Na presente investigação, em mulheres recém-diagnosticadas com câncer de mama, as concentrações de AGE e pentosidina no plasma foram semelhantes aos controles. Estes resultados podem ser atribuídos ao fato de que as participantes foram bem pareadas por idade e IMC, não faziam uso de antioxidantes ou suplementos, não eram tabagistas, e não apresentavam outras comorbidades com exceção de dislipidemia. Mesmo assim, a exclusão de anormalidades lipídicas não alterou os achados. Interessante foi o achado de menor concentração de AGE totais e pentosidina em estágios avançados do câncer de mama (III e IV) em comparação com a doença localizada (estágios I e II). Notadamente, a doença avançada agrega, principalmente, tumores triplo-negativos, os quais são referidos como tendo uma maior concentração de lípidos circulantes⁸⁰, embora o mesmo não tenha sido observado nesta investigação.

Não é possível esclarecer a menor concentração de AGE totais e pentosidina observada em tumores avançados. É possível que este achado esteja relacionado à ação de outros sistemas contrarreguladores, incluindo as enzimas glicoxalase I e II, o que merece investigação futura. Os oxoaldeídos reativos que precedem a formação dos AGE são desintoxicados pelo sistema da glicoxalase. O metilglicoxal é convertido em S-D-lactoilglutathione pela ação da glicoxalase 1 e depois em D-lactato pela glicoxalase 2⁴⁷. Particularmente, a glicoxalase 1 (GLO-1) é altamente expressa em tecidos tumorais e se correlaciona positivamente com a quantidade de carboximetil-lisina⁴⁸. A glicoxalase 1 também é altamente expressa em linhagens celulares de câncer de mama (MCF7 e MDA-MB-231) e se correlaciona positivamente com tumores de alto grau. Por outro lado, o silenciamento de GLO-1 (siRNA-Glo1) previne a invasão e migração de células tumorais de mama e induz a apoptose^{65, 81}. Outros sistemas de detoxificação enzimáticos são descritos, porém pouco elucidados até o momento⁸²⁻⁸³. Recentemente, demonstrou-se que a atividade antioxidante da HDL isolada do plasma de mulheres com câncer de mama triplo-negativo é aumentada em comparação com controles pareadas⁸⁴, o que pode contribuir para a redução da concentração de AGE, os quais são, em geral, formados por reações de glicoxidação.

Fontes exógenas de AGE incluem a dieta, principalmente vinculada à cocção a seco em altas temperaturas e a alimentos ricos em gorduras e carboidratos. Os AGE de origem dietética são absorvidos no trato gastrointestinal e transportados na circulação em associação à albumina e lipoproteínas. Dietas ricas em AGE são estudadas em modelos animais e relacionadas ao estabelecimento de anormalidades metabólicas que atuam como predisponentes a vários tipos de cânceres⁸⁵⁻⁸⁶. De outro lado, em humanos a restrição de AGE dietética favorece a melhora do perfil metabólico, com redução da resistência insulínica, melhora do perfil glicêmico e lipídico e das defesas antioxidantes, graças à elevação de sirtuína 1. Ainda a limitação de AGE na dieta favorece a melhora do prognóstico de mulheres com câncer de mama⁸³. Em animais, a restrição dietética em AGE aumenta a expectativa de vida, em comparação a aqueles que recebem dieta rica em AGE, com mesmo aporte calórico^{85, 88-89}. Apesar das investigações onde os constituintes da dieta são

semelhantes, variando-se a apenas a forma de cocção que acarreta na geração de AGE, na vida prática a redução de AGE na alimentação vincula-se à diminuição da ingestão de alimentos gordurosos e ultra processados, o que limita a compreensão do papel isolado dos AGE na fisiopatologia de várias doenças em humanos. O tabagismo é outra importante fonte de AGE, por meio da inalação de compostos gerados durante a queima do tabaco. Entretanto, mulheres tabagistas não foram incluídas na casuística deste estudo.

Recentemente, num estudo caso-controle incluindo 2039 indivíduos (1018 com câncer de mama e 1021 controles pareados), as concentrações elevadas de AGE e a razão AGE/sAGER foram associadas a um risco aumentado de câncer de mama, com associação negativa entre sAGER e o risco de câncer de mama, especialmente em mulheres com menos de 60 anos. Além disso, os AGE foram associados com um pior prognóstico do câncer, sendo apontados como possíveis marcadores de risco e evolução da doença⁹⁰. Maiores concentrações de sAGER estão associadas à uma maior sobrevida e a um prognóstico mais favorável em indivíduos com câncer de mama, sugerindo que o sAGER pode ter propriedades antitumorais e proteger contra a progressão da doença. Por outro lado, concentrações mais baixas de sAGER estão associadas a um pior prognóstico e aumento da invasão e metástase em alguns tipos de câncer de mama⁶⁸⁻⁶⁹. Assim como ocorre com outras doenças crônicas, como diabetes mellitus e doença renal crônica, o papel exato do sAGER no câncer de mama ainda está sendo investigado, mas é possível que sua capacidade de se ligar a ligantes pró-inflamatórios possa modular a resposta imune e a inflamação no microambiente tumoral⁹¹. Além disso, o sAGER pode inibir a ligação do AGER inserido na membrana plasmática aos seus ligantes, reduzindo potencialmente a atividade pró-tumoral do AGER⁹².

Existem limitações na presente investigação, incluindo a ausência de uma avaliação das fontes dietéticas de AGE que poderiam contribuir para o *pool* corporal de AGE⁷⁴. A concentração de AGE circulante pode não ser representativa dos AGE no microambiente tumoral e outros tipos de AGE, além daqueles estimados por fluorimetria, podem ter um impacto no câncer de mama. Nesse sentido, a técnica padrão-ouro (espectrometria de massas) é cara e

trabalhosa e pode não ser facilmente aplicada na rotina prática de determinação dos AGE.

6.1 Conclusão

Os achados da presente investigação demonstram uma redução nas concentrações plasmáticas de AGE nos estágios avançados do câncer de mama. Embora contraditório com outros estudos, a investigação foi realizada em uma grande população de mulheres câncer de mama sem tratamento oncológico em andamento ou cirurgia anterior e na ausência de comorbidades associadas ao aumento do estresse carbonílico. Embora alguns estudos sugiram que os AGE podem ter potencial como biomarcadores para o câncer de mama, ainda há evidências limitadas e contraditórias sobre sua utilidade. Além disso, existem preocupações sobre a confiabilidade e reprodutibilidade das medições de AGE, bem como a falta de ensaios padronizados e valores de corte. A relação entre AGE e câncer ainda não é totalmente compreendida e não está claro como os AGE podem ser influenciados por outros fatores, como idade, dieta e comorbidades. Portanto, mais estudos são necessários para validar o uso dos AGE como biomarcadores ou mediadores do câncer de mama e para estabelecer sua relevância clínica e utilidade no prognóstico, na orientação de decisões terapêuticas e acompanhamento clínico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Maillard, Louis Camille. "Action Des Acides Amines Sur Les Sucres; Formation Des Melanoidies Par Voie Methodique." *Cr. Acad. Sci.* 154 (1912): 66-68.
- (2) Hodge Je. The Amadori Rearrangement. *Adv Carbohydr Chem.* 1955;10:169-205. Doi: 10.1016/S0096-5332(08)60392-6. Pmid: 13292324.
- (3) Patton, A.R., Hill, E.G. Inactivation Of Nutrients By Heating With Glucose. *Science*, V.16, N.107, P.2768-2769, 1948.
- (4) Holmquist Wr, Schroeder Wa. Properties And Partial Characterization Of Adult Human Hemoglobin A1c. *Biochim Biophys Acta.* 1964 Mar 16;82:639-41. Doi: 10.1016/0304-4165(64)90466-0. Pmid: 14148841.
- (5) Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney Hm. Studies Of An Unusual Hemoglobin In Patients With Diabetes Mellitus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969 Aug 22;36(5):838-43. Doi: 10.1016/0006-291x(69)90685-8. Pmid: 5808299.
- (6) Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced Glycation End-Products: A Review. *Diabetologia.* 2001 Feb;44(2):129-46. Doi: 10.1007/S001250051591. Erratum In: *Diabetologia* 2002 Feb;45(2):293. Pmid: 11270668.
- (7) Barbosa, Júnia Hp; Oliveira, Suzana L.; Seara, Luci Tojal. O Papel Dos Produtos Finais Da Glicação Avançada (Ages) No Desencadeamento Das Complicações Vasculares Do Diabetes. *Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia*, V. 52, P. 940-950, 2008.
- (8) Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role Of Advanced Glycation End Products In Cellular Signaling. *Redox Biol.* 2014 Jan 9;2:411-29. Doi: 10.1016/J.Redox.2013.12.016. Pmid: 24624331; Pmcid: Pmc3949097.
- (9) Júnia H. Porto Barbosa, Isis T. Souza, Antônio E. G. Santana E Marília O. F. Goulart. *Quim. Nova*, V. 39, N. 5, P. 608-620, 2016.
- (10) Rabbani N, Thornalley Pj. Advanced Glycation End Products In The Pathogenesis Of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2018 Apr;93(4):803-813. Doi: 10.1016/J.Kint.2017.11.034. Epub 2018 Feb 22. Pmid: 29477239.
- (11) Bellier J, Nokin Mj, Lardé E, Karoyan P, Peulen O, Castronovo V, Bellahcène A. Methylglyoxal, A Potent Inducer Of Ages, Connects Between Diabetes And Cancer. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019 Feb;148:200-211. Doi: 10.1016/J.Diabres.2019.01.002. Epub 2019 Jan 18. Pmid: 30664892.
- (12) Shangari N, O'brien Pj. The Cytotoxic Mechanism Of Glyoxal Involves Oxidative Stress. *Biochem Pharmacol.* 2004 Oct 1;68(7):1433-42. Doi: 10.1016/J.Bcp.2004.06.013. Pmid: 15345333.

- (13) Mclellan Ac, Thornalley Pj. Glucose Activity In Human Red Blood Cells Fractionated By Age. *Mech Ageing Dev.* 1989 Apr;48(1):63-71. Doi: 10.1016/0047-6374(89)90026-2. Pmid: 2725076.
- (14) Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids.* 2003 Dec;25(3-4):275-81. doi: 10.1007/s00726-003-0017-9. Epub 2003 Jul 29. PMID: 14661090.
- (15) Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism.* 1998 Nov;47(11):1348-53. doi: 10.1016/s0026-0495(98)90303-1. PMID: 9826211.
- (16) 16- Uribarri, J.; Castillo, M. D.; Maza, M. P.; Filip, R.; Gugliucci, A.; Luevano-Contreras, C.; Macías-Cervantes, M. H.; Bastos, D. H.; Medrano, A.; Menini, T.; Portero-Otin, M.; Rojas, A.; Sampaio, G. R.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Garay-Sevilla, M. E.; Dietary Advanced Glycation End Products. And Their Role In Health And Disease. *Advances In Nutrition*, V.6, N.4, P.461-473, 2015.
- (17) Sattarahmady, Naghmeh & Moosavi-Movahedi, Ali & Habibi-Rezaei, Mehran. (2011). A Biophysical Comparison of Human Serum Albumin to be Glycated In Vivo and In Vitro. *Journal of Medical Biochemistry.* 30. 10.2478/v10011-010-0026-7.
- (18) Gugliucci A, Bendayan M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia.* 1996 Feb;39(2):149-60. doi: 10.1007/BF00403957. PMID: 8635666.
- (19) Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska Am, Koziolkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (Ages): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, And Diseases Related To Ages. *Cells.* 2022 Apr 12;11(8):1312. Doi: 10.3390/Cells11081312. Pmid: 35455991; Pmcid: Pmc9029922
- (20) Schmidt Am, Hori O, Cao R, Yan Sd, Brett J, Wautier JI, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D. RAGE: A Novel Cellular Receptor For Advanced Glycation End Products. *Diabetes.* 1996 Jul;45 Suppl 3:S77-80. Doi: 10.2337/Diab.45.3.S77. Pmid: 8674899.
- (21) Shen Cy, Lu Ch, Wu Ch, Li Kj, Kuo Ym, Hsieh Sc, Yu Cl. The Development Of Maillard Reaction, And Advanced Glycation End Product (Age)-Receptor For Age (Rage) Signaling Inhibitors As Novel Therapeutic Strategies For Patients With Age-Related Diseases. *Molecules.* 2020 Nov 27;25(23):5591. Doi: 10.3390/Molecules25235591. Pmid: 33261212; Pmcid: Pmc7729569.
- (22) Zhang L, Bukulin M, Kojro E, Roth A, Metz VV, Fahrenholz F, Nawroth PP, Bierhaus A, Postina R. Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases. *J Biol Chem.* 2008 Dec 19;283(51):35507-16. doi: 10.1074/jbc.M806948200. Epub 2008 Oct 24. PMID: 18952609.

- (23) Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 2008 Oct;22(10):3716-27. doi: 10.1096/fj.08-109033. Epub 2008 Jul 4. PMID: 18603587.
- (24) Hanford LE, Enghild JJ, Valnickova Z, Petersen SV, Schaefer LM, Schaefer TM, Reinhart TA, Oury TD. Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem*. 2004 Nov 26;279(48):50019-24. doi: 10.1074/jbc.M409782200. Epub 2004 Sep 20. PMID: 15381690; PMCID: PMC1868562.
- (25) Buckley ST, Ehrhardt C. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:917108. doi: 10.1155/2010/917108. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20145712; PMCID: PMC2817378.
- (26) Grauen Larsen H, Marinkovic G, Nilsson Pm, Nilsson J, Engström G, Melander O, Orho-Melander M, Schiopu A. High Plasma Srage (Soluble Receptor For Advanced Glycation End Products) Is Associated With Slower Carotid Intima-Media Thickness Progression And Lower Risk For First-Time Coronary Events And Mortality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 May;39(5):925-933. Doi: 10.1161/Atvbaha.118.312319. Pmid: 30917679.
- (27) Erusalimsky Jd. The Use Of The Soluble Receptor For Advanced Glycation-End Products (Srage) As A Potential Biomarker Of Disease Risk And Adverse Outcomes. *Redox Biol*. 2021 Jun;42:101958. Doi: 10.1016/J.Redox.2021.101958. Epub 2021 Mar 29. Pmid: 33839083; Pmcid: Pmc8113049.
- (28) Pinto RS, Minanni CA, de Araújo Lira AL, Passarelli M. Advanced Glycation End Products: A Sweet Flavor That Embitters Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 22;23(5):2404. doi: 10.3390/ijms23052404. PMID: 35269546; PMCID: PMC8910157.
- (29) Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med*. 1995 Sep;1(6):634-46. PMID: 8529130; PMCID: PMC2229987.
- (30) Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):11047-52. doi: 10.1073/pnas.93.20.11047. PMID: 8855306; PMCID: PMC38281.
- (31) Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, Zaguia A, Koundal S, Belay A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int*. 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.

(32) Global Cancer Observatory – Internacional Agency for Research on Cancer [Internet]. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/infographics/world-cancer-day-2021/> [citado 2023 MAR 20]

(33) Gucaip A, Traina Ta, Eisner Jr, Parker Js, Selitsky Sr, Park Bh, Elias Ad, Baskin-Bey Es, Cardoso F. Male Breast Cancer: A Disease Distinct From Female Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jan;173(1):37-48. Doi: 10.1007/S10549-018-4921-9. Epub 2018 Sep 28. Pmid: 30267249; Pmcid: Pmc7513797.

(34) Giordano SH. Breast Cancer in Men. *N Engl J Med.* 2018 Jun 14;378(24):2311-2320. doi: 10.1056/NEJMra1707939. PMID: 29897847..

(35) Shaaban Am, Sloane Jp, West Cr, Moore Fr, Jarvis C, Williams Em, Foster Cs. Histopathologic Types Of Benign Breast Lesions And The Risk Of Breast Cancer: Case-Control Study. *Am J Surg Pathol.* 2002 Apr;26(4):421-30. Doi: 10.1097/00000478-200204000-00003. Pmid: 11914619.

(36) Chalasani P, Livingston R. Differential Chemotherapeutic Sensitivity For Breast Tumors With "Brcaness": A Review. *Oncologist.* 2013;18(8):909-16. Doi: 10.1634/Theoncologist.2013-0039. Epub 2013 Jul 23. Pmid: 23881989; Pmcid: Pmc3755927.

(37) Criscitiello C, Corti C. Breast Cancer Genetics: Diagnostics And Treatment. *Genes (Basel).* 2022 Sep 6;13(9):1593. Doi: 10.3390/Genes13091593. Pmid: 36140761; Pmcid: Pmc9498728.

(38) Tamimi, R.M., Et Al. Population Attributable Risk Of Modifiable And Nonmodifiable Breast Cancer Risk Factors In Postmenopausal Breast Cancer. *American Journal Of Epidemiology*, V.184, N. 12, P. 884-893, 2016.

(39) Colozza, M., Azambuja, E., Cardoso, F., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccard, M.J. Proliferative Markers As Prognostic And Predictive Tools In Early Breast Cancer: Where Are We Now? *Annals Of Oncology*, V.16, N.11, P.1723-39, 2005.

(40) Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160-7. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370. Epub 2009 Feb 9. PMID: 19204204; PMCID: PMC2667820.

(41) Goldhirsch A, Wood Wc, Coates As, Gelber Rd, Thürlimann B, Senn Hj; Panel Members. Strategies For Subtypes--Dealing With The Diversity Of Breast Cancer: Highlights Of The St. Gallen International Expert Consensus On The Primary Therapy Of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011 Aug;22(8):1736-47. Doi: 10.1093/annonc/Mdr304. Epub 2011 Jun 27. Pmid: 21709140; Pmcid: Pmc3144634.

(42) Fitzgibbons Pl, Bradley La, Fatheree La, Alsabeh R, Fulton Rs, Goldsmith Jd, Haas Ts, Karabakhtsian Rg, Loykasek Pa, Marolt Mj, Shen Ss, Smith At, Swanson Pe; College Of American Pathologists Pathology And Laboratory

Quality Center. Principles Of Analytic Validation Of Immunohistochemical Assays: Guideline From The College Of American Pathologists Pathology And Laboratory Quality Center. Arch Pathol Lab Med. 2014 Nov;138(11):1432-43. Doi: 10.5858/Arpa.2013-0610-Cp. Epub 2014 Mar 19. Pmid: 24646069.

(43) Lakhani Sr, Ellis Io, Schnitt Sj, Et Al., Eds. World Health Organisation Classification Of Tumors. Who Classification Of Tumors Of The Breast. Lyon: Iarc Press; 2012.

(44) Cserni G. Histological Type And Typing Of Breast Carcinomas And The Who Classification Changes Over Time. Pathologica. 2020 Mar;112(1):25-41. Doi: 10.32074/1591-951x-1-20. Pmid: 32202537; Pmcid: Pmc8138497.

(45) Giuliano Ae, Edge Sb, Hortobagyi Gn. Eighth Edition Of The Ajcc Cancer Staging Manual: Breast Cancer. Ann Surg Oncol. 2018 Jul;25(7):1783-1785. Doi: 10.1245/S10434-018-6486-6. Epub 2018 Apr 18. Pmid: 29671136

(46) Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. J Gen Physiol. 1927 Mar 7;8(6):519-30. doi: 10.1085/jgp.8.6.519. PMID: 19872213; PMCID: PMC2140820.

(47) Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. Front Neurosci. 2015 Feb 9;9:23. doi: 10.3389/fnins.2015.00023. PMID: 25709564; PMCID: PMC4321437.

(48) Van Heijst Jw, Niessen Hw, Hoekman K, Et Al. Advanced Glycation End Products In Human Cancer Tissues: Detection Of N Epsilon-(Carboxymethyl)Lysine And Argpyrimidine. Annals Of The New York Academy Science, V.1043, P.725-733, 2005.

(49) Wang J, Yang X, Wang Z, Wang J. Role of the Glyoxalase System in Breast Cancer and Gynecological Cancer-Implications for Therapeutic Intervention: a Review. Front Oncol. 2022 Jul 8;12:857746. doi: 10.3389/fonc.2022.857746. PMID: 35898868; PMCID: PMC9309216.

(50) Germanová A, Germanová A, Tesarová P, Jáchymová M, Zvára K, Zima T, Kalousová M. Glyoxalase I Glu111Ala polymorphism in patients with breast cancer. Cancer Invest. 2009 Jul;27(6):655-60. doi: 10.1080/07357900802350822. PMID: 19452310.

(51) Tesarová P, Kalousová M, Trnková B, Soukupová J, Argalássová S, Mestek O, Petruzelka L, Zima T. Carbonyl and oxidative stress in patients with breast cancer--is there a relation to the stage of the disease? Neoplasma. 2007;54(3):219-24. PMID: 17447853.

(52) Walter, K.R., Ford, M.E., Gregoski, M.J., Kramer, R.M., Knight, K.D., Spruill, L., Nogueira, L.M., Krisanits, B.A., Phan, V., La Rue, Ac.C., Lilly, M.B., Ambs, S., Cham, K, Turner, T.F., Varner, H., Singh, S. Uribarri, J. Advanced Glycation End Products Are Elevated In Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients, Alter Response To Therapy, And Can Be Targeted By Lifestyle Intervention. Breast Cancer Research And Treatment, V. 147, P. 625-634, 2018.

- (53) Nass N, Ignatov A, Andreas L, Weißenborn C, Kalinski T, Sel S. Accumulation of the advanced glycation end product carboxymethyl lysine in breast cancer is positively associated with estrogen receptor expression and unfavorable prognosis in estrogen receptor-negative cases. *Histochem Cell Biol*. 2017 May;147(5):625-634. doi: 10.1007/s00418-016-1534-4. Epub 2016 Dec 23. PMID: 28012130.
- (54) Lee Kj, Yoo Jw, Kim Yk, Choi Jh, Ha Ty, Gil M. Advanced Glycation End Products Promote Triple Negative Breast Cancer Cells Via Erk And Nf-Kb Pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 15;495(3):2195-2201. Doi: 10.1016/J.Bbrc.2017.11.182. Epub 2017 Dec 2. Pmid: 29196260.
- (55) Matou-Nasri S, Sharaf H, Wang Q, Almobadel N, Rabhan Z, Al-Eidi H, Yahya Wb, Trivilegio T, Ali R, Al-Shanti N, Ahmed N. Biological Impact Of Advanced Glycation Endproducts On Estrogen Receptor-Positive Mcf-7 Breast Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Nov;1863(11):2808-2820. Doi: 10.1016/J.Bbadis.2017.07.011. Epub 2017 Jul 13. Pmid: 28712835.
- (56) Mattson Mp. Hormesis Defined. *Ageing Res Rev*. 2008 Jan;7(1):1-7. Doi: 10.1016/J.Arr.2007.08.007. Epub 2007 Dec 5. Pmid: 18162444; Pmcid: Pmc2248601.
- (57) Nokin Mj, Durieux F, Bellier J, Peulen O, Uchida K, Spiegel Da, Cochrane Jr, Hutton Ca, Castronovo V, Bellahcène A. Hormetic Potential Of Methylglyoxal, A Side-Product Of Glycolysis, In Switching Tumours From Growth To Death. *Sci Rep*. 2017 Sep 15;7(1):11722. Doi: 10.1038/S41598-017-12119-7. Pmid: 28916747; Pmcid: Pmc5600983.
- (58) Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics*. 2001 Oct;1(10):1295-302. doi: 10.1002/1615-9861(200110)1:10<1295::AID-PROT1295>3.0.CO;2-F. PMID: 11721641.
- (59) Cao J, Lou S, Ying M, Yang B. DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. *Biochem Pharmacol*. 2015 Feb 1;93(3):241-50. doi: 10.1016/j.bcp.2014.11.012. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25498803
- (60) Tesarová P, Zima T, Kubena Aa, Kalousova M. Polymorphisms Of The Receptor For Advanced Glycation End Products And Glyoxalase I And Long-Term Outcome In Patients With Breast Cancer. *Tumour Biol*. 2017 Jul;39(7):1010428317702902. Doi: 10.1177/1010428317702902. Pmid: 28695773.
- (61) Nankali M, Karimi J, Goodarzi MT, Saidijam M, Khodadadi I, Razavi AN, Rahimi F. Increased Expression of the Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) Is Associated with Advanced Breast Cancer Stage. *Oncol Res Treat*. 2016;39(10):622-628. doi: 10.1159/000449326. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27710974.
- (62) Nasser, M.W., Wani, N.A., Ahirwar, D.K., Powell, C.A., Ravi, J., Elbaz, M., Zhao, H., Padilla, L., Zhang, X., Shilo, K., Ostrowski, M., Shapiro, C., Carson We 3rd, Ganju Rk: Rage Mediates S100a7-Induced Breast Cancer Growth And

Metastasis By Modulating The Tumor Microenvironment. *Cancer Research*, V. 75, P. 974-985, 2015.

(63) Kwak T, Drews-Elger K, Ergonul A, Miller Pc, Braley A, Hwang Gh, Zhao D, Besser A, Yamamoto Y, Yamamoto H, El-Ashry D, Slingerland Jm, Lippman Me, Hudson Bi. Targeting Of Rage-Ligand Signaling Impairs Breast Cancer Cell Invasion And Metastasis. *Oncogene*. 2017 Mar;36(11):1559-1572. Doi: 10.1038/Onc.2016.324. Epub 2016 Sep 26. Pmid: 27669433.

(64) Peng Y, Liu F, Qiao Y, Wang P, Du H, Si C, Wang X, Chen K, Song F. Genetically Modified Circulating Levels of Advanced Glycation End-Products and Their Soluble Receptor (AGEs-RAGE Axis) with Risk and Mortality of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 12;14(24):6124. doi: 10.3390/cancers14246124. PMID: 36551607; PMCID: PMC9776370.

(65) Nokin MJ, Bellier J, Durieux F, Peulen O, Rademaker G, Gabriel M, Monseur C, Charlotaux B, Verbeke L, van Laere S, Roncarati P, Herfs M, Lambert C, Scheijen J, Schalkwijk C, Colige A, Caers J, Delvenne P, Turtoi A, Castronovo V, Bellahcène A. Methylglyoxal, a glycolysis metabolite, triggers metastasis through MEK/ERK/SMAD1 pathway activation in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2019 Jan 23;21(1):11. doi: 10.1186/s13058-018-1095-7. PMID: 30674353; PMCID: PMC6343302.

(66) Synold T, Xi B, Wuenschell GE, Tamae D, Figarola JL, Rahbar S, Termini J. Advanced glycation end products of DNA: quantification of N2-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2008 Nov;21(11):2148-55. doi: 10.1021/tx800224y. PMID: 18808156; PMCID: PMC3253819.

(67) de Gonzalo-Calvo D, López-Vilaró L, Nasarre L, et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological study. *BMC Cancer*. 2015;15:460. Published 2015 Jun 9. doi:10.1186/s12885-015-1469-5

(68) 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*. 2013;15(5):R87. doi:10.1186/bcr3483

(69) Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, et al. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science*. 2013;342(6162):1094-1098. doi:10.1126/science.1241908

(70) Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Mel'nikova TI, Porozov YB, Terentiev AA. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3085756. Published 2019 Aug 14. doi:10.1155/2019/3085756

(71) Nass N, Brömme HJ, Hartig R, Korkmaz S, Sel S, Hirche F, Ward A, Simm A, Wiemann S, Lykkesfeldt AE, Roessner A, Kalinski T. Differential response to α -oxoaldehydes in tamoxifen resistant MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*.

2014 Jul 1;9(7):e101473. doi: 10.1371/journal.pone.0101473. Erratum in: PLoS One. 2014;9(7):e104322. PMID: 24983248; PMCID: PMC4077828.

(72) Tesarová P, Kalousová M, Jáchymová M, Mestek O, Petruzalka L, Zima T. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)--soluble form (sRAGE) and gene polymorphisms in patients with breast cancer. *Cancer Invest.* 2007 Dec;25(8):720-5. doi: 10.1080/07357900701560521. PMID: 18058469.

(73) Tesarova P, Zima T, Kubena AA, Kalousova M. Polymorphisms of the receptor for advanced glycation end products and glyoxalase I and long-term outcome in patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2017 Jul;39(7):1010428317702902. doi: 10.1177/1010428317702902. PMID: 28695773.

(74) Walter KR, Ford ME, Gregoski MJ, Kramer RM, Knight KD, Spruill L, Nogueira LM, Krisanits BA, Phan V, La Rue AC, Lilly MB, Ambis S, Chan K, Turner TF, Varner H, Singh S, Uribarri J, Garrett-Mayer E, Armeson KE, Hilton EJ, Clair MJ, Taylor MH, Abbott AM, Findlay VJ, Peterson LL, Magwood G, Turner DP. Advanced glycation end products are elevated in estrogen receptor-positive breast cancer patients, alter response to therapy, and can be targeted by lifestyle intervention. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Feb;173(3):559-571. doi: 10.1007/s10549-018-4992-7. Epub 2018 Oct 27. PMID: 30368741; PMCID: PMC6394600.

(75) Pan S, Guan Y, Ma Y, Cui Q, Tang Z, Li J, Zu C, Zhang Y, Zhu L, Jiang J, Liu Z. Advanced glycation end products correlate with breast cancer metastasis by activating RAGE/TLR4 signaling. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2022 Mar;10(2):e002697. doi: 10.1136/bmjdr-2021-002697

(76) Perrone A, Giovino A, Benny J, Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Mar 18;2020:3818196. doi: 10.1155/2020/3818196. PMID: 32256950; PMCID: PMC7104326.

(77) Pinto RS, Ferreira GS, Silvestre GCR, Santana MFM, Nunes VS, Ledesma L, Pinto PR, de Assis SIS, Machado UF, da Silva ES, Passarelli M. Plasma advanced glycation end products and soluble receptor for advanced glycation end products as indicators of sterol content in human carotid atherosclerotic plaques. *Diab Vasc Dis Res.* 2022 Jan-Feb;19(1):14791641221085269. doi: 10.1177/14791641221085269. PMID: 35343275; PMCID: PMC8965288.

(78) Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, Ueda T, Fusegawa T, Kuwajima S, Takeuchi M, Koike T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism.* 1998 Nov;47(11):1348-53. doi: 10.1016/s0026-0495(98)90303-1. PMID: 9826211.

(79) van Deemter M, Ponsioen TL, Bank RA, Snabel JM, van der Worp RJ, Hooymans JM, Los LI. Pentosidine accumulates in the aging vitreous body: a gender effect. *Exp Eye Res.* 2009 Jun;88(6):1043-50. doi: 10.1016/j.exer.2009.01.004. Epub 2009 Jan 19. Erratum in: *Exp Eye Res.* 2010

Aug;91(2):320-2. Erratum in: *Exp Eye Res.* 2010 Jun;90(6):802-4. PMID: 19450456.

(80) Sawada MIBAC, de Fátima Mello Santana M, Reis M, et al. Increased plasma lipids in triple-negative breast cancer and impairment in HDL functionality in advanced stages of tumors. *Sci Rep.* 2023;13(1):8998. Published 2023 Jun 2. doi:10.1038/s41598-023-35764-7

(81) Rulli A, Carli L, Romani R, Baroni T, Giovannini E, Rosi G, Talesa V. Expression of glyoxalase I and II in normal and breast cancer tissues. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Mar;66(1):67-72. doi: 10.1023/a:1010632919129. PMID: 11368412.

(82) Monnier VM, Sell DR. Prevention and repair of protein damage by the Maillard reaction in vivo. *Rejuvenation Res.* 2006 Summer;9(2):264-73. doi: 10.1089/rej.2006.9.264. PMID: 16706654.

(83) Rigoldi F, Donini S, Giacomina F, Sorana F, Redaelli A, Bandiera T, Parisini E, Gautieri A. Thermal stabilization of the deglycating enzyme Amadoriase I by rational design. *Sci Rep.* 2018 Feb 14;8(1):3042. doi: 10.1038/s41598-018-19991-x. PMID: 29445091; PMCID: PMC5813194.

(84) Campos AL, Sawada MIBAC, Santana MFM, et al. The increased antioxidant action of HDL is independent of HDL cholesterol plasma levels in triple-negative breast cancer. *Front Oncol.* 2023;13:1111094. Published 2023 Mar 9. doi:10.3389/fonc.2023.1111094

(85) Peppia M, Mavroeidi I. Experimental Animal Studies Support the Role of Dietary Advanced Glycation End Products in Health and Disease. *Nutrients.* 2021 Sep 29;13(10):3467. doi: 10.3390/nu13103467. PMID: 34684468; PMCID: PMC8539226.

(86) Omofuma OO, Turner DP, Peterson LL, Merchant AT, Zhang J, Steck SE. Dietary Advanced Glycation End-products (AGE) and Risk of Breast Cancer in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO). *Cancer Prev Res (Phila).* 2020 Jul;13(7):601-610. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0457. Epub 2020 Mar 13. PMID: 32169887; PMCID: PMC7335328.

(87) Omofuma OO, Peterson LL, Turner DP, Merchant AT, Zhang J, Thomson CA, Neuhouser ML, Snetselaar LG, Caan BJ, Shadyab AH, Saquib N, Banack HR, Uribarri J, Steck SE. Dietary Advanced Glycation End-Products and Mortality after Breast Cancer in the Women's Health Initiative. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2021 Dec;30(12):2217-2226. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-21-0610. Epub 2021 Sep 28. PMID: 34583965; PMCID: PMC8643311.

(88) Deng G, Zhang L, Wang C, Wang S, Xu J, Dong J, Kang Q, Zhai X, Zhao Y, Shan Z. AGEs-RAGE axis causes endothelial-to-mesenchymal transition in early calcific aortic valve disease via TGF- β 1 and BMPR2 signaling. *Exp Gerontol.* 2020 Nov;141:111088. doi: 10.1016/j.exger.2020.111088. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32911032.

- (89) Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 22;91(24):11704-8. doi: 10.1073/pnas.91.24.11704. PMID: 7972128; PMCID: PMC45300.
- (90) Peng Y, Liu F, Qiao Y, Wang P, Du H, Si C, Wang X, Chen K, Song F. Genetically Modified Circulating Levels of Advanced Glycation End-Products and Their Soluble Receptor (AGEs-RAGE Axis) with Risk and Mortality of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Dec 12;14(24):6124. doi: 10.3390/cancers14246124. PMID: 36551607; PMCID: PMC9776370.
- (91) Krechler T, Jáchymová M, Mestek O, Zák A, Zima T, Kalousová M. Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer. *Clin Biochem*. 2010 Jul;43(10-11):882-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.04.004. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20398646.
- (92) Jing R, Cui M, Wang J, Wang H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) soluble form (sRAGE): a new biomarker for lung cancer. *Neoplasma*. 2010;57(1):55-61. doi: 10.4149/neo_2010_01_055. PMID: 19895173.

Anexos

Anexo I



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 glicoxalase 1 serão determinadas no plasma por ELISA e as de óxidos de colesterol, no plasma e nas frações de HDL2 e HDL3, por espectrometria de massa, e associadas com o prognóstico do tumor. Além disso, as HDL isoladas serão testadas quanto à sua habilidade em remover colesterol celular e inibir a oxidação. Os resultados serão importantes para compreensão do envolvimento dos AGEs e óxidos de colesterol na evolução do câncer de mama, de acordo com o predito por sua classificação molecular e análise genética, com foco especial na função das HDL.

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

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

responsabilidade do Dr. André 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

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

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

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

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

Critérios de inclusão: 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.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar em mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama invasivo, estágios I e II: - a associação entre a concentração plasmática de óxidos de colesterol, produtos de glicação avançada, glioxalase 1 e receptor solúvel de AGE com o prognóstico da doença de acordo com sua classificação molecular ; - 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; e- a relação entre as variáveis metabólicas supracitadas e o escore de recorrência de 21 genes (Oncotype DX – Recurrence score).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

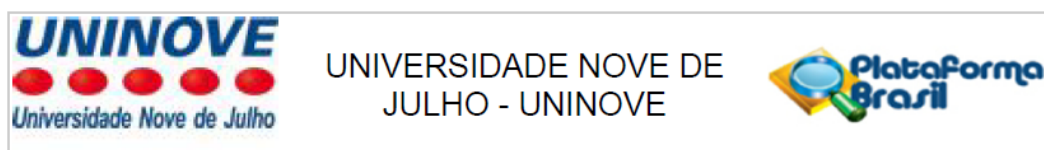
CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comitedeetica@uninove.br



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_BÁSICAS_DO_PROJETO_1261822.pdf	23/01/2019 13:20:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	tcle_pacientes.pdf	23/01/2019 13:19:45	Marisa Passarelli	Aceito

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3385-9010

E-mail: comitedeetica@uninove.br



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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Benefícios: Não há benefícios diretos aos participantes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi atualizado

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

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

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

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

À
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 II

STROBE Statement—checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i>—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i>—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i>—Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants (b) <i>Cohort study</i>—For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i>—For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe

comparability of assessment methods if there is more than one group

Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias
Study size	10	Explain how the study size was arrived at
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions (c) Explain how missing data were addressed (d) <i>Cohort study</i>—If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i>—If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i>—If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy (e) Describe any sensitivity analyses

Continued on next page

Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) <i>Cohort study</i>—Summarise follow-up time (eg, average and total amount)
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i>—Report numbers of outcome events or summary measures over time <i>Case-control study</i>—Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure <i>Cross-sectional study</i>—Report numbers of outcome events or summary measures
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses

Discussion

Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence

Generalisability 21 Discuss the generalisability (external validity) of the study results

Other information

Funding 22 Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

Anexo III

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 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 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 encontrada 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 Lípidos (LIM 10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo apenas durante o período de realização do estudo. Em caso de necessidade de utilização posterior das amostras será pedido novo consentimento após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

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

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

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

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

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

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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