

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“Caracterização do perfil de dano oxidativo em carcinoma mamário e  
avaliação de associação com parâmetros histopatológicos”***

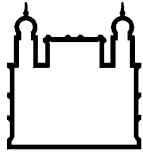
*por*

***Thales Nascimento e Castro***

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências  
na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientadora principal: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Vianna-Jorge  
Segunda orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marcia Cristina Paes*

*Rio de Janeiro, maio de 2015.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta dissertação, intitulada*

***“Caracterização do perfil de dano oxidativo em carcinoma mamário e avaliação de associação com parâmetros histopatológicos”***

*apresentada por*

***Thales Nascimento e Castro***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita de Cássia Elias Estrela Marins

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosane Vianna-Jorge – Orientadora principal

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

C355c Castro, Thales Nascimento e  
Caracterização do perfil de dano oxidativo em carcinoma  
mamário e avaliação de associação com parâmetros  
histopatológicos. / Thales Nascimento e Castro. -- 2015.  
61 f. : il. ; tab. ; graf.

Orientador: Rosane Vianna-Jorge  
Marcia Cristina Paes

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública  
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

1. Neoplasias da Mama. 2. Estresse Oxidativo. 3. Radicais  
Livres - metabolismo. 4. Imuno-Histoquímica.  
5. Heterogeneidade Genética. I. Título.

CDD – 22.ed. – 614.

*Dedico essa dissertação aos meus pais Ronaldo e Rosaly, por me proporcionarem a realização de mais este sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela conclusão de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais Ronaldo e Rosaly, não a palavras que expressem toda a minha satisfação neste momento, pois sem vocês nada disso seria possível. Ao meu irmão Michel por todo apoio e carinho. Muito obrigado família por estarem ao meu lado, me apoiando e incentivando.

Ao Rodrigo Garcia (in memoria) por todo companheirismo, cumplicidade e apoio. Por ter estado sempre ao meu lado, me dando força e não permitindo que eu desistisse. Obrigado por ter me incentivado a chegar onde cheguei.

Agradeço ao Felipe Dezerto, por todo o carinho e dedicação nos últimos tempos. Por compreender meu desespero, minha inquietude e todo o meu estresse. Obrigado por fazer parte da minha vida, e me dar força para seguir meu caminho.

Agradeço a minha amiga e irmã Hayra, por estar todo esse tempo ao meu lado, me dando força e apoio para finalizar essa etapa. São 8 anos de companheirismo nos estudos e nas pesquisas, um sempre ao lado do outro. Obrigado amiga, por me permitir concluir ao seu lado mais uma etapa de minha vida.

A mudança para o Rio e o início do mestrado trazem muitos presentes, dentre eles minha querida Daniely, uma “grande pequena menina” que sempre esteve ao meu lado no laboratório, uma amiga para todas as horas.

Agraço a minha família aqui no Rio, as minhas amigas Ana e Cintian que moram comigo, por estarem sempre ao meu lado, dando força e apoio.

A Divisão de Patologia do INCA, pois este trabalho não teria sido realizado sem o seu apoio. Agradeço imensamente a Dr.<sup>a</sup> Maria Theresa Accioly por tudo, pela sua dedicação, companheirismo, ensinamentos e pela amizade construída ao longo desse tempo. Obrigado The, pela grande amiga que se tornou, por ter me apoiado nos momentos de desesperos e por compartilhar uma etapa tão importante de minha vida. Agradeço também a Priscila Valverde

que durante a minha passagem nesta divisão foi muito prestativa e carinhosa e a Dr.<sup>a</sup> Ana Lucia Eisemberg pela dedicação e por seus ensinamentos.

Não poderia deixar de agradecer a minha orientadora Rosane Vianna Jorge, por me receber em seu laboratório e acreditar em mim. Obrigado por todo apoio, pelo carinho, pelo ensinamento e pela amizade construída ao longo desses anos. Pois sem você nada disso teria sido possível.

Agradeço também a minha segunda orientadora Marcia Cristina Paes, por contribuir na elaboração deste trabalho e por abrir as portas do seu laboratório para mim. Agradeço a todo seu grupo de pesquisa, em especial a Nathalia, Jéssica, Frances, Mauricio e Gustavo por me receberem tão bem.

Agradeço também ao LabCon na UFRJ, em especial ao Professor Samuel Valença pela oportunidade de conhecer seu laboratório e pelos conselhos. A todos os seus alunos, em especial ao Emanuel, Manu, Adriane e a Marina em que tive a oportunidade de ter uma grande amizade.

Ao Dr. Guilherme Suarez Kurtz, pela oportunidade de trabalhar no laboratório da Divisão de Farmacologia do INCA.

Ao meu grupo de pesquisa de Farmacologia Clínica e Atenção Farmacêutica no CPq, obrigado por toda dedicação. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa equipe.

Nesta etapa tão importante, não poderia de deixar de agradecer a todos os amigos que estiveram presente em minha vida, em especial ao João Carlos, Claudinho, Nayla, Diego, Lucas e Marcelo que de alguma forma contribuíram para a finalização desta etapa, compreendendo minha ausência e meu estresse ao longo desse período. Obrigado amigos por me aturar todo esse tempo, pois minha vida não teria a menor graça sem vocês.

*Posso, tudo posso Naquele que me fortalece,  
nada nem ninguém no mundo vai me fazer desistir.  
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos  
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar  
(Celina Borges)*

## Resumo

O carcinoma mamário é uma doença complexa que engloba diversas alterações genéticas e bioquímicas, além de mudanças no microambiente tumoral, tais como o estresse oxidativo, que pode ocasionar danos estruturais em lipídios, proteínas, bem como no DNA nuclear. O presente estudo teve por objetivo caracterizar o perfil oxidativo de neoplasias mamárias, comparando o perfil de expressão de produtos dos processos de peroxidação lipídica, nitração proteica e oxidação de DNA em função de parâmetros histopatológicos com valor prognóstico quanto à evolução clínica do câncer de mama. O estudo teve um desenho observacional analítico seccional, envolvendo espécimes tumorais parafinadas (N = 300) provenientes de uma coorte hospitalar de mulheres com câncer de mama unilateral e não metastático (N = 696). A caracterização do dano oxidativo foi feita pela técnica de imuno-histoquímica, usando-se anticorpos monoclonais para os marcadores 4-hidroxinonenal (4-HNE), 3-Nitrotirosina (3-Nitro), e 8-hidroxideoguanosina (8-OHdG). A imunomarcagem foi realizada apenas nos casos de carcinoma ductal invasivo, sendo selecionados todos os casos disponíveis dos subtipos *HER2-like* (N = 34) e Triplo-Negativo (N = 55), e os primeiros casos dos subtipos Luminal A (N = 106) e Luminal B (N = 105). As reações de imunomarcagem foram quantificadas em função da extensão (percentual de células imunomarcadas) e da intensidade, sendo classificadas como: extensão restrita (grau 0-3) ou ampla (grau 4) e intensidade fraca (graus 0-1) ou forte (graus 2-3). O produto (grau de extensão) x (grau de intensidade) foi considerado como escore global da expressão de cada marcador, sendo classificado como baixo (escores 0-2), intermediário (escores 3-6) ou alto (escores 8-12). Foi observado predomínio de imunomarcagem ampla (> 50%) e de intensidade forte (> 40%) entre as amostras de carcinoma de mama para os três anticorpos avaliados. Com relação ao impacto de características morfológicas do tumor (tamanho e grau) e do subtipo molecular, não foram observadas diferenças significativas nos padrões de expressão de 4-HNE e 3-Nitro. Em relação ao 8-OHdG, foi observada significativa redução ( $p < 0,01$ ) da extensão e da intensidade da imunomarcagem entre tumores maiores do que 2 cm (18% e 11% respectivamente), de alto grau histológico (29% e 13% respectivamente), ou classificados como Triplo-Negativos (25% e 10% respectivamente). A análise multivariada do impacto destes três parâmetros (tamanho > 2cm, alto grau histológico e subtipo Triplo-Negativo) sobre o escore global de expressão tumoral 8-OHdG indicou efeitos independentes apenas para o subtipo Triplo-Negativo ( $OR_{ajustado} = 2,8$ ;  $IC95\% = 1,3 - 6,1$ ) e para tamanho tumoral > 2cm ( $OR_{ajustado} = 2,6$ ;  $IC95\% = 1,1 - 6,3$ ). Contudo, quando o tamanho tumoral foi analisado separadamente entre tumores Triplo-Negativos ou entre os demais subtipos (Luminal A/B e *HER2-like*), não se observou efeito significativo sobre a expressão de 8-OHdG. Em conclusão, os dados indicam que alguns tumores Triplo-Negativos são mais resistentes a danos oxidativos sobre DNA, independentemente de grau ou tamanho tumoral, o que pode contribuir para o perfil de maior agressividade deste subtipo tumoral.

Palavras-chave: Neoplasias de mama, estresse oxidativo; 3-nitrotirosina ;4-hidroxinonenal; 8-hidroxidesoxiguanosina; imuno-histoquímica.



## Abstract

Breast cancer is a complex disease that involves multiple genetic and biochemical alterations and changes in the tumor microenvironment, such as oxidative stress, which can lead to structural damages to lipids, proteins and nuclear DNA. The present work aimed to characterize the oxidative profile of mammary tumors, comparing the products of profile expression of lipid peroxidation processes, protein nitration and DNA oxidation according to histopathological parameters with prognostic value as to clinical evolution of breast cancer. The study was a cross-sectional observational analytic design, involving paraffin tumor specimens (N = 300) from a hospital cohort of women with unilateral breast cancer and non-metastatic (N = 696). The characterization of oxidative damage has been done by immunohistochemistry, using monoclonal antibodies to markers 4-hydroxynonenal (4-HNE), 3-nitrotyrosine (3-Nitro), and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG). The immunostaining was performed only in cases of invasive ductal carcinoma by selecting all available cases of the subtype HER2-like (N = 34) and Triple-Negative (n = 55) and of the first cases of subtypes Luminal A (N = 106) and Luminal B (N = 105). The immunostaining reactions were quantified by the extent (percentage of immunostained cells) and intensity, being classified as: restricted extension (grade 0-3) or wide extension (grade 4) and low intensity (grades 0-1) or strong intensity (grades 2-3). The product (degree of extension) x (degree of intensity) was the overall score of the expression of each marker and is classified as low (scores 0-2), intermediate (score 3-6) or high (scores 8-12). The predominance of the wide immunostaining (> 50%) and high intensity (> 40%) between breast carcinoma samples for the three antibodies was observed. With respect to the impact tumor morphology (size, extent) and the molecular subtype there were no significant differences in the patterns of expression of 4-HNE and 3-Nitro. Regarding the 8-OHdG there was a significant reduction ( $p < 0.01$ ) of the extent and the intensity of immunostaining of tumors larger than 2 cm (18% and 11% respectively) with high histological grade (29% and 13 %, respectively) or classified as triple-negative (25% and 10% respectively). Multivariate analysis of the impact of these three parameters (size > 2 cm, high histological grade and triple-negative subtype) on the overall score of 8-OHdG tumor expression showed independent effects only for triple-negative subtype ( $OR_{adjusted} = 2.8$ , 95% CI = 1.3 - 6.1) and tumor size > 2 cm ( $OR_{adjusted} = 2.6$ , 95% CI 1.1- 6.3). However, when the tumor size was analyzed separately from Triple-Negative tumors or among the other subtypes (luminal A / B and HER2-like), there was no significant effect on the expression of 8-OHdG. In conclusion, the data indicate that some triple-negative tumors are more resistant to oxidative damage over the DNA, regardless of tumor grade or size, which may contribute to the more aggressive subtype of the tumor.

Key words: breast neoplasms, oxidative stress, 3-nitrotyrosine, 4-hydroxynonenal, 8-hydroxydeoxyguanosine, immunohistochemistry

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	02
<b>2.1. Carcinogênese</b> .....	02
<b>2.2. Interação do tumor com o microambiente</b> .....	04
2.2.1. Hipóxia.....	06
2.2.2. Radicais livres e defesas antioxidantes.....	07
2.2.3. Estresse oxidativo.....	09
2.2.3.1. Biomarcadores de dano oxidativo.....	09
<b>2.3. Anatomia e fisiologia da mama normal</b> .....	11
<b>2.4. Câncer de mama</b> .....	14
2.4.1. Fisiopatologia.....	14
2.4.2. Epidemiologia.....	14
2.4.3. Heterogeneidade do câncer de mama.....	16
2.4.3.1. Heterogeneidade morfológica.....	16
2.4.3.2. Heterogeneidade molecular.....	17
2.4.4. Estresse oxidativo no câncer de mama.....	19
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	23
4.1. Principal.....	23
4.2. Específico.....	23
<b>5. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	24
<b>5.1. Delineamento</b> .....	24
<b>5.2. População do estudo</b> .....	24
5.2.1. Critérios de Inclusão.....	24
5.2.2. Critérios de Exclusão.....	24
5.2.3. Caracterização histopatológica.....	24
<b>5.3. Análises imuno-histoquímicas</b> .....	25
5.3.1. Logística de seleção de espécimes tumorais e preparo de lâminas.....	25
5.3.2. Etapa de padronização dos ensaios de imunomarcção.....	26
5.3.3. Técnica de Imuno-histoquímica.....	26
5.3.4. Estudo histomorfométrico.....	27
<b>5.4. Análise estatística</b> .....	28
<b>6. RESULTADOS</b> .....	29
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	46
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47
<b>ANEXO I</b> .....	58
<b>ANEXO II</b> .....	59

<b>ANEXO III</b> .....	60
<b>ANEXO IV</b> .....	61

## LISTA DE TABELAS

*Tabela 01: Características clínicas e histopatológicas das pacientes de câncer de mama.....* 30

*Tabela 02: Características histopatológicas e redução de dano oxidativo ao DNA em carcinoma mamário.....* 41

## LISTA DE FIGURAS

*Figura 01: Capacidades adquiridas na carcinogênese .....* 04

*Figura 02: Microambiente tumora l.....* 05

*Figura 03: Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....* 08

*Figura 04: Anatomia de mama durante a puberdade não gravídica.....* 12

*Figura 05: Glândula mamária inativa e ativa.....* 13

*Figura 06: Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes na população feminina mundial em 2012.....* 15

*Figura 07: Esquema apresentando os vários subtipos de câncer de mama.....* 17

*Figura 08: Fluxograma de formação da coorte prospectiva de câncer de mama.....* 29

*Figura 09: Padrão de imunomarcção do anticorpo 4-HNE.....* 32

*Figura 10: Padrão de imunomarcção do anticorpo 3-Nitro.....* 33

*Figura 11: Padrão de imunomarcção do anticorpo 8-OHdG.....* 34

*Figura 12: Histogramas de distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore das reações de imunomarcção dos indicadores de dano oxidativo.....* 35

*Figura 13: Histogramas de distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore das reações de imunomarcção para 4-HNE.....* 38

*Figura 14: Histogramas de distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore das reações de imunomarcção para 3-Nitro.....* 39

*Figura 15: Histogramas de distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore das reações de imunomarcção para 8-OHdG.....* 40

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

LOO•	Radical peroxila
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> ,	Oxigenio singleteo
4-HNE	4-hidroxinonenal
3-Nitro	3-Nitrotirosina
8-OHdG	8-hidroxideoguanosina
AP-1	Proteína ativadora 1
CAT	Catalase
CDI	Carcinoma ductal invasivo
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
c-NOS	Oxido nítrico sintetase constitutiva
FAC	Fibroblastos associado ao tumor
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GSTs	Glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de hidrogênio
HClO	cido hipocloroso
HER-2	Receptor de crescimento epidermal humano do tipo 2
HGF	Fatores de crescimento de hepatócitos
HIF-1	Fator de indução de hipóxia – 1
HRE	Elemento de resposta de hipóxia
i-NOS	Oxido nítrico sintetase induzível
L•	Radical alquila
LO•	Radical alcoxila
MDA	Malondialdeido
N	Nitrogênio
•NO	xido nítrico
NOS	xido nítrico sintetase
O <sub>2</sub>	Oxigenio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OGG1	8-oxo-guaninaglicosilase
OH•	Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RE	Receptor de estrogênio
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP	Receptor de progesterona
SOD	Superóxido dismutase
UICC	Uno Internacional Contra o Câncer
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer no mundo vem aumentando rapidamente nos últimos anos em decorrência do envelhecimento da população mundial e da crescente exposição a fatores de risco ambientais. A Organização Mundial da Saúde estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos novos de câncer e 17 milhões de mortes por câncer [1].

O câncer de mama é considerado um problema de saúde pública mundial devido a sua alta incidência e por ser a principal causa de morte por câncer entre as mulheres [2]. Nos últimos anos, tem havido enormes avanços e descobertas sobre os mecanismos e fatores envolvidos na carcinogênese mamária [3]. Entretanto, a busca por marcadores moleculares relacionados à evolução da doença ainda continua, a fim de identificar as pacientes que apresentam maior risco de recorrência e metástase, e que, portanto, necessitariam de acompanhamento mais rigoroso [4]. Neste contexto, além das características moleculares do tumor, outros processos fisiológicos como a resposta imune e inflamatória, a interação entre o tumor e o microambiente tecidual [5,6] e os mecanismos de angiogênese podem contribuir para a variabilidade na progressão tumoral e para o risco de complicações associadas ao tratamento antineoplásico [7].

Há poucos relatos sobre o perfil redox de pacientes com câncer de mama [3], embora se reconheça que células tumorais apresentem distúrbios do metabolismo que podem influenciar positivamente ou negativamente a produção de moléculas oxidantes e antioxidantes [8]. Em câncer de mama, a produção de espécies reativas de oxigênio parece estar envolvida em processos mutagênicos que levam à iniciação e à progressão tumoral [9]. Além da própria doença, os procedimentos cirúrgicos e os tratamentos à base de quimioterapia e/ou radioterápicos podem induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, ocasionando danos celulares, que poderão contribuir para a progressão ou recidiva do tumor [10,11].

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CARCINOGENESE

O processo da carcinogênese é classicamente dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão [12,13]. A primeira etapa consiste na exposição da célula a uma dose suficiente de um agente carcinogênico (iniciador), responsável por alterar genes-chave necessários para a manutenção da homeostasia celular [14,15]. A etapa seguinte do processo de carcinogênese é a promoção, caracterizada pela expansão das células inicialmente mutadas, as quais sofrem o efeito de agentes que não são mutagênicos, porém que promovem a expansão da população celular que carrega uma mutação inicial [16–18]. O terceiro e último estágio é a progressão, que é caracterizada pela multiplicação celular descontrolada, sendo um processo irreversível [16].

#### Iniciação

Os agentes iniciadores podem ser ambientais (químicos, físicos ou biológicos) ou endógenos (citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), capazes de causar uma mutação genética não letal [19]. A exposição celular a esses agentes leva a alterações nos mecanismos responsáveis pelo processo de proliferação [20] e diferenciação celular, iniciando a formação neoplásica [21]. Contudo, uma única alteração genética é raramente suficiente para o desenvolvimento de um tumor, sendo necessárias várias etapas com alterações sucessivas em genes específicos [22]. As células “iniciadas” permanecem latentes até que sobre elas atuem agentes promotores [23].

Os alvos de maior importância nas de lesões genéticas são os genes reguladores, dentre os quais, quatro classes apresentam papel chave no desenvolvimento do câncer, que são: os protooncogenes, genes supressores do tumor, genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e os genes envolvidos no reparo do DNA [21]. Em suas configurações normais, eles dirigem o ciclo celular em uma sequência de eventos pelos quais as células crescem e se dividem [24].

Os protooncogenes são reguladores fisiológicos da proliferação e da diferenciação celular [24]. A ocorrência de mutação nesses genes os transforma em oncogenes, que são carcinogênicos e causam multiplicação celular excessiva [22]. Os genes supressores de tumores, em contraste, contribuem para o desenvolvimento do câncer quando são inativados por mutação. O resultado é a perda da ação de genes supressores funcionais, o que priva a célula de controles cruciais para inibição de crescimento inapropriado [24,25].

Um ponto crítico no processo de formação do tumor são as mutações nos genes que regulam a apoptose, uma vez que eles inibem a morte celular programada, facilitando assim o acúmulo de células anormais [15]. As mutações nos genes de reparo do DNA afetam de modo indireto a proliferação e a sobrevivência celular ao influenciar na capacidade de um organismo de reparar lesões causadas em outros genes [26]. Essa incapacidade de reparo pode predispor à mutações no genoma e conseqüentemente a transformação neoplásica [27].

As células que sofrem esses processos estão associadas ao processo de divisão celular e hereditariedade, ou seja, ao entrar em divisão celular, a célula é capaz de repassar mutações adquiridas para suas descendentes [22,24].

### Promoção

Os fatores de promoção podem ser agentes químicos, processos inflamatórios, hormonais e fatores que atuam no crescimento celular normal [15]. Esses agentes aumentam a proliferação celular nos tecidos suscetíveis, contribuem para a fixação das mutações e causam mudanças no controle do crescimento celular [17].

É importante considerar que os agentes promotores não têm ação mutagênica nem carcinogênica e que para conseguir efeito biológico, devem persistir no ambiente [23]. A promoção é uma fase reversível, após o desaparecimento de um agente promotor, pode ocorrer uma regressão na proliferação celular [15].

### Progressão

Nessa etapa o câncer já está instalado, evoluindo de uma lesão pré-maligna a maligna, e representa o processo final da carcinogênese, resultando na instalação e evolução da neoplasia [16,28]. Neste estágio, as células transformadas apresentam autonomia para proliferar, podendo ocorrer perda da coesão e obtenção da mobilidade, tornando-se invasivas [17].

A formação do tumor não envolve apenas a transformação celular, mas também um conjunto de células normais que estão ao redor das células neoplásicas formando o microambiente tumoral [29], e alterações biológicas que são adquiridas para auxiliar na carcinogênese [15]. Foram enumeradas por Hanahan *et al.* (2000) seis alterações biológicas básicas, que são: autossuficiência em relação aos fatores de crescimento; insensibilidade aos inibidores de crescimento; evasão à morte celular programada por apoptose; potencial ilimitado de replicação; angiogênese sustentada; invasão tecidual e disseminação à distância (Figura 01) [30].





Figura 01: Capacidades adquiridas na carcinogênese. Ocorrem de maneira semelhante nos processos de desenvolvimento dos tumores, através de funções originadas por diversos mecanismos e estratégias celulares. Adaptado de (HANAHAAN *et al.*, 2000).

## 2.2 INTERAÇÃO DO TUMOR COM O MICROAMBIENTE

As células cancerígenas não existem isoladamente, elas estão dentro de um meio complexo, conhecido como microambiente tumoral [31]. Esse meio consiste em vários tipos de células imersas no estroma, que desempenha um papel fundamental na progressão do tumor [32].

A expansão bem sucedida de tumores malignos requer uma colaboração ativa entre células tumorais e estromais através de interações celulares heterotípicas. Sendo assim, a comunicação e a troca de informação entre essas células ocorre através do contato direto célula-célula, bem como a liberação de moléculas de sinalização [33]. De um modo recíproco, as células tumorais influenciam no estroma e vice-versa, conduzindo conjuntamente a progressão do câncer [34].

O estroma é classificado em duas regiões, que são: a matriz extracelular, composta por proteoglicanos, ácido hialurônico e proteínas fibrosas, e pelas células estromais, que incluem células de suporte (fibroblastos), células do sistema vascular (pericitos) e as células do sistema imunitário [32,33]. A Figura 02 adaptada de Juntilla *et al.* (2013) descreve as células presentes no microambiente tumoral. Contudo, com o desenvolvimento e progressão do tumor, as células estromais e da matriz extracelular sofrem alterações morfológicas dramáticas que influenciam nos estágios da carcinogênese [32].

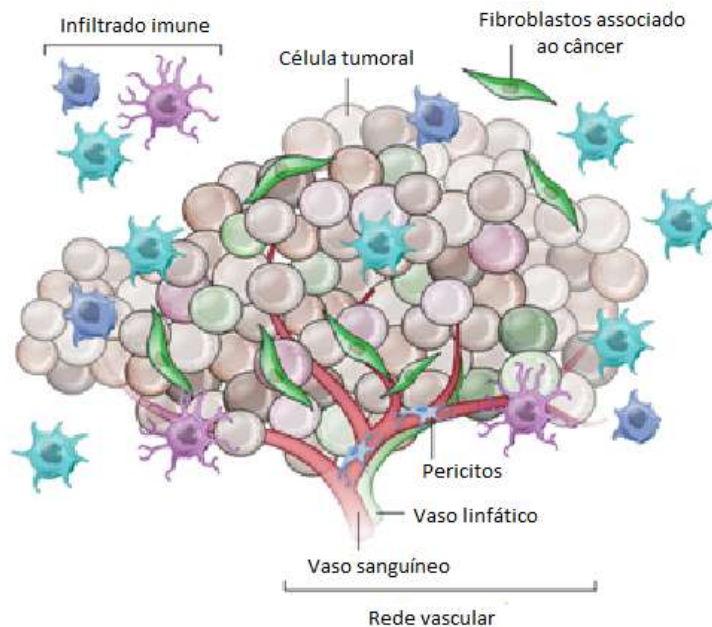


Figura 02: Microambiente tumoral. Formação do tumor envolvendo células neoplásicas em conjunto com a matriz extracelular e endotelial vascular, estroma e células do sistema imunológico. Adaptado de (JUNTILA *et al.*, 2013).

As células mais abundantes na matriz extracelular tumoral são os fibroblastos associados ao tumor (FAC). Essas células são fibroblastos diferenciados e ativados por dano tecidual, com a finalidade de dar suporte ao reparo celular [31]. Na carcinogênese, os FAC são responsáveis por estimular o crescimento celular, inflamação, angiogênese e invasão [35]. No microambiente tumoral os FAC secretam citosinas e fatores de crescimento, tais como: fator derivado de células estromais 1, fator de crescimento endotelial vascular - VEGF; fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF e fatores de crescimento de hepatócitos (HGF) [31], estimulando assim, a angiogênese e crescimento das células tumorais [32].

A presença no microambiente de VEGF, PDGF, citocinas e condições de hipóxia é um processo necessário para o desenvolvimento do tumor, uma vez que estimulam as células endoteliais e os pericitos durante a neovascularização [34]. Os pericitos são importantes no processo de angiogênese, pois são células estromais perivascularres responsáveis por proporcionar suporte estrutural aos novos vasos sanguíneos [31].

Em quase todos os tipos de tumores é observado infiltrado inflamatório com diversos subtipos de leucócitos, incluindo as células mielóides e linhagem linfóides, cuja complexidade e status de ativação variam dependendo da localização do tecido/órgão e da fase de malignidade [36]. As células inflamatórias fornecem mediadores mitogênicos diretos e

indiretos de crescimento que estimulam a proliferação de células neoplásicas, assim como outros tipos de células do estroma na sua vizinhança [34].

No câncer de mama, estudos vêm demonstrando que o microambiente está envolvido na progressão da neoplasia mamária. Porém é pouco compreendido quais mecanismos moleculares ativam as células do microambiente que serão responsáveis por promover ou iniciar o câncer [37–39]. As principais células envolvidas na iniciação do câncer de mama são os fibroblastos e as células inflamatórias [40]. Ao serem ativados, os fibroblastos modificam as características do estroma da mama, deixando mais fibrosos, aumentando desta forma o risco de câncer de mama [41]. As células inflamatórias por sua vez, atuam no processo de regeneração tecidual contínuo levando a uma maior chance de ocorrência de mutações. É criada desta forma uma microrregião mutagênica, devido a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células imunes recrutadas [40].

### **2.2.1 Hipóxia**

Os níveis de oxigênio nos tecidos variam consideravelmente dentro e entre os diferentes órgãos, sendo a hipóxia caracterizada pela redução do nível normal da tensão de oxigênio no tecido, ocorrendo durante doenças vasculares agudas e crônicas, doença pulmonar e cânceres [42]. Podem também ocorrer localmente por vários motivos, tais como a proliferação celular aumentada, inflamação, fibrose e lesões [43].

O crescimento do tumor, e conseqüentemente aumento do número de células, resulta em elevado consumo de oxigênio, gerando um ambiente de hipóxia [44]. A hipóxia tecidual é um fator de estímulo ao surgimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), favorecendo a expansão da rede de vascularização tumoral [45]. Entretanto, a divisão celular comumente ocorre mais rapidamente do que a angiogênese, e os vasos sanguíneos que se formam dentro dos cânceres são estruturalmente e funcionalmente anormais, sendo insuficientes para suprir a demanda de oxigênio tecidual [46]. Em tumores de mama, essa falta de irrigação sanguínea leva à privação de glicose devida à hipóxia, e esta privação da glicose induz rapidamente ao estresse oxidativo no microambiente tumoral [47].

Embora a hipóxia seja tóxica tanto para as células normais como para células cancerígenas, as células cancerígenas sofrem alterações genéticas e adaptativas que lhes permitem sobreviver e proliferar em um ambiente hipóxico. [42]. Além disso, a hipóxia dispara várias cascatas de sinalização que afetam significativamente a progressão tumoral, incluindo a angiogênese, a seleção para resistência à apoptose, a resistência à radiação e

quimioterapia, e o aumento da invasão e metástase [48]. A hipóxia também origina um gradiente de estresse oxidativo mediado por peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) capaz de promover a heterogeneidade da célula cancerosa, aumentando o potencial mutacional, que ajuda a selecionar células com resistência a terapias convencionais antitumorais [49].

Em vários tipos de cânceres humano, a presença de hipóxia intratumoral foi identificada como um fator prognóstico adverso para o resultado do paciente, e este efeito é independente dos parâmetros prognósticos já estabelecidos, como o estágio clínico do tumor, grau histológico e status de linfonodo [45].

Muitas das alterações na expressão genética observada em condições de hipóxia são controladas pelo fator de indução de hipóxia - 1 (HIF-1), que é um fator de transcrição especificamente ativado por privação de oxigênio [50]. Na ausência de oxigênio, HIF-1 se liga ao seu local específico chamado HRE (elemento de resposta de hipóxia), presente na região promotora de genes alvo, tais como transportador de glicose-1, VEGF e a maioria das enzimas glicolíticas, o que permite que a célula tumoral se adapte às condições de baixa de oxigênio [46].

### 2.2.2 Radicais livres e defesas antioxidantes

Define-se como radical livre toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos [51]. Este desemparelhamento de elétrons confere alta reatividade a essas moléculas, tornando-as capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, causando assim, reações de óxido-redução [52].

Os principais elementos responsáveis por participarem de reações de óxido-redução no organismo humano são: oxigênio (O) e nitrogênio (N) [53]. Os produtos formados nessas reações nem sempre apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, mas ainda assim são altamente reativos, como por exemplo, o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Figura 03) [54]. Por este motivo, tais moléculas são atualmente denominadas “espécies reativas”, evitando-se o termo “radical livre” [52]. As espécies reativas de oxigênio (ROS – “*reactive oxygen species*”), bem como as espécies reativas de nitrogênio (RNS – “*reactive nitrogen species*”), são moléculas altamente instáveis, quimicamente muito reativas, apresentando meia-vida curta e alta patogenicidade [55].

Espécies reativas também podem ser produzidas por xantinas oxidases, NADPH oxidases, citocromo P450-oxidase, pela auto-oxidação, dentre outras [55]. Podem ser geradas

também por fontes exógenas, tais como medicamentos, radiações gama e ultravioleta, tabaco, poluentes ambientais e dieta [56].

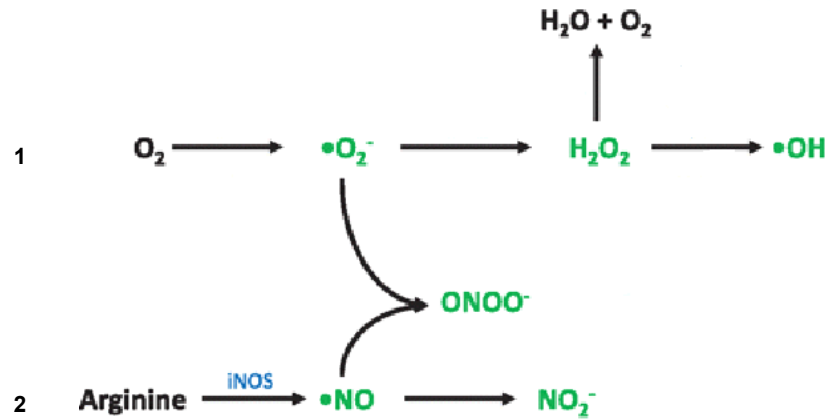


Figura 03: Formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. 1 - Redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) a água ( $H_2O$ ), com formação de espécies reativas como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $\bullet OH$ ). 2 - Redução da arginina a nitrito com formação de óxido nítrico ( $\bullet NO$ ) que reage com  $\bullet O_2^-$  produzindo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) Adaptado de (BORLACE et al., 2012).

O excesso tanto de ROS como RNS apresenta efeitos prejudiciais para o organismo humano, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA [57,58]. Porém o excesso dessas espécies reativas no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com a definição de antioxidante proposta por Halliwell e Gutteridge (1989), antioxidante é "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada com a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do referido substrato" [59].

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com a estrutura do agente antioxidante em enzimáticos e não enzimáticos [55]. Os antioxidantes enzimáticos são, por exemplo a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx) e os não enzimáticos incluem vitamina E e C, ubiquinona e flavonoides [52].

### 2.2.3 Estresse oxidativo

A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes. O rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante favorece injúrias celulares, sendo esta condição denominada estresse oxidativo [51,54]. A causa desse desequilíbrio pode ser devido a fatores exógenos, como exposição ambiental a oxidantes e ingestão inadequada de antioxidantes, e a fatores endógenos, como alterações enzimáticas e processos patológicos [60]. Desta forma, a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante ou o aumento da geração de espécies oxidantes (ROS e RNS), podem resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares, que se não forem reparadas, poderão alterar a funcionalidade de células, órgãos e tecidos [61].

Os principais alvos de espécies reativas incluem os lipídeos, proteínas, açúcares e DNA [62], sendo que a preferência da ocorrência do ataque depende de muitos fatores, como local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula [61,62].

#### 2.2.3.1 Biomarcadores de dano oxidativo

##### 2.2.3.1.1 - Biomarcadores de dano lipídico

Os danos oxidativos aos lipídeos são resultados dos ataques das espécies reativas sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radical alquila ( $L\bullet$ ), alcóxila ( $LO\bullet$ ) e peróxila ( $LOO\bullet$ ), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e em uma condição extrema à morte celular [63,64]. Este processo é conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e usado como indicador de estresse oxidativo celular [64,65]. Dentre os indicadores de peroxidação lipídica propostos para investigação do estresse oxidativo, destacam-se o malondialdeído (MDA), os hidroperóxidos lipídicos (4-hidroxinonenal) e os dienos conjugados, pentano, etano e os  $F_2$ -isoprostanos [66].

O 4-hidroxinonenal (4-HNE) é um dos indicadores mais importantes do processo da peroxidação lipídica, sendo considerado o mais estável [67]. Este produto tem a capacidade de difundir-se dentro das membranas ou mesmo em locais distantes de sua formação, podendo reagir com proteínas citosólicas formando vários adutos (resíduos de cisteína, lisina e histidina) que são capazes de induzir respostas específicas de estresse oxidativo, tal como

sinalização celular [68]. O 4-HNE pode reagir também com as mitocôndrias, resultando na menor produção de ATP, formação de poros danificados, prejudicando o controle de qualidade das proteínas e reduzindo a viabilidade mitocondrial e celular [66]. Além disto, o excesso de 4-HNE nas células pode afetar a transcrição de pro-oncogenes, incluindo a c-jun e a proteína ativadora 1 (AP-1) através das vias de proteína-quinase ativada por mitógeno [67].

A principal via de eliminação do 4-HNE se dá pela glutatona S-transferase (GSTs), que catalisa a conjugação de glutatona (GSH) a 4-HNE através da adição de Michel, impedindo assim que uma nova adição nucleofílica seja realizada por este composto [68].

#### 2.2.3.1.2. Biomarcadores de dano proteico

A oxidação de proteínas decorre principalmente da ação das espécies reativas diretamente a sua estrutura, sobre os grupos tióis (grupamento sulfidril e metionil), ou através de moléculas originadas de processos de oxidação como produto da peroxidação lipídica ou do metabolismo do óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) [69]. O  $\cdot\text{NO}$  é formado a partir do aminoácido L-arginina por meio de uma reação catalisada por uma família de enzimas: as NO-sintases (NOS), que convertem a L-arginina em  $\cdot\text{NO}$  e L-citrulina [70]. Esta enzima apresenta diferentes isoformas, sendo as principais, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de calmodulina e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas [71].

A produção de  $\cdot\text{NO}$  decorrente da ação desta enzima reage com o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), produzindo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é uma espécie altamente reativa capaz de oxidar e nitrar componentes celulares, tais como resíduos de tirosina das proteínas [72]. A nitração da tirosina é uma modificação pós-translacional em que o  $\text{ONOO}^-$  reage com o anel aromático fenólico da tirosina através da adição de um grupo  $\text{NO}_2$  para formar 3-nitrotirosina (3-NITRO) [73]. O  $\text{ONOO}^-$  também reage com antioxidantes endógenos, como ascorbato, glutatona e SOD. Algumas das consequências da oxidação e nitração proteica são prejuízo de processos de transporte ativo, citólise e morte celular [9].

A principal via de eliminação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é através da enzima SOD associada com isoenzimas distintas localizadas na mitocôndria, citoplasma e compartimentos extracelulares. Já o  $\cdot\text{NO}$  é rapidamente removido por difusão através de tecidos e em células vermelhas do sangue, onde é rapidamente convertido em nitrato por reação com oxi-hemoglobina [74].

A oxidação de proteínas pelo  $\cdot\text{NO}$  é um importante marcador de dano oxidativo decorrentes de RNS, uma vez que seus produtos são estáveis e facilmente quantificados em matrizes biológicas como sangue, urina e tecido [73].

#### 2.2.3.1.3. Biomarcadores de dano ao DNA

O dano oxidativo ao DNA pode ocorrer por oxidação direta dos ácidos nucleicos, o que pode levar à ocorrência de quebras de cadeia [62]. A principal espécie reativa que causa dano no DNA é a radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), que ataca tanto as bases nitrogenadas como as desoxirriboses. O ataque às desoxirriboses podem ser realizadas por abstração de um átomo de hidrogênio o que quase sempre leva a ruptura da cadeia de DNA e consequentemente exposição das bases nitrogenadas, que ficam expostas e mais susceptíveis ao ataque das espécies reativas [57]. A guanina por apresentar um alto potencial redutor é a principal base que sofre ação das espécies reativas pela oxidação no C-8, gerando como produto principal o 8-hidroxideoguanosina (8-OHdG). Esta molécula é potencialmente mutagênica, uma vez que tem a capacidade de emparelhar com resíduos de adenina, aumentando a frequência de translocações espontâneas G:C ---T:A [75].

A aferição do composto 8-OHdG vem sendo comumente realizada, e este tem sido apontado como o biomarcador de maior relevância na avaliação do dano oxidativo ao DNA uma vez que está relacionada com mutagênese e consequente carcinogênese [60,62]. Um dos principais mecanismos de reparo das lesões de DNA causadas pelo estresse oxidativo é via 8-oxo-guaninaglicosilase (OGG1) que é uma enzima de reparação de excisão de base que remove a lesão mutagênica 8-OHdG do DNA [76]. Atualmente são conhecidos sete subtipos desta enzima, sendo a maioria localizada no núcleo [77].

Quando essas lesões causadas ao DNA não são reparadas ou removidas pelo organismo, podem levar as células a morte ou resultarem na incorporação de mutações no genoma [62], que podem ser transportadas para gerações futuras ou mesmo causar efeitos genotóxicos severos, gerando instabilidade genômica até aparecimento de cânceres [62,78].

## 2.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA MAMA FEMININA NORMAL

O tecido mamário é composto de epitélio especializado e estroma. A maioria do estroma mamário consiste em tecido conjuntivo fibroso denso misturado com tecido adiposo (estroma interlobular). Os lóbulos são confinados por um estroma mamário específico



hormonalmente responsivo, delicado e mixomatoso que contém uma disseminação de linfócitos (estroma intralobular) [79]. Seis a dez dos principais sistemas ductais originam-se no mamilo. O epitélio escamoso queratinizado da pele sobrejacente continua dentro dos ductos e então muda abruptamente para um epitélio cuboide de camada dupla. A pele areolar circunjacente é pigmentada e sustentada por musculatura lisa [79].

Do nascimento até a puberdade, a glândula mamária é imatura e encontra-se no estado de quiescência, no qual não há crescimento. Sua composição nessa fase envolve apenas os seios e ductos galactóforos, constituídos por porções dilatadas e ramificações [80]. Durante a puberdade, hormônios ovarianos estimulam um rápido alongamento dos ductos e conseqüentemente a diferenciação em células do epitélio luminal e células mioepiteliais que compõem o sistema de ductos (Figura 03) [80]. Na mulher adulta, as ramificações do ducto terminal criam um agrupamento de ácinos pequenos semelhante à uva para formar o lóbulo [79].

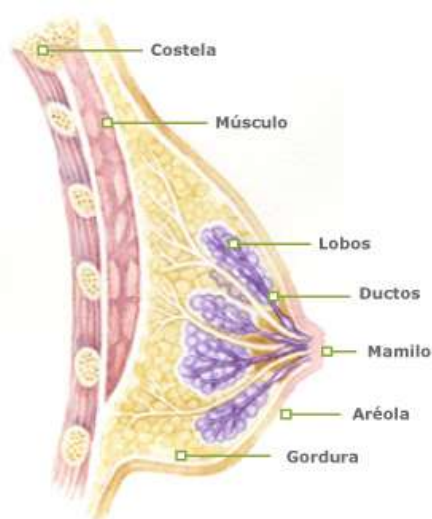


Figura 04 Anatomia de mama durante a puberdade não gravídica

Fonte: <http://www.pop.eu.com/porta/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/qual-a-estrutura-normal-da-mama.html>

Na mama normal, os ductos e lóbulos são forrados por dois tipos de células. Uma camada inferior, plana e descontínua de células contráteis contendo miofilamentos (células mioepiteliais) que ficam sobre a membrana basal [79] e uma segunda camada de células epiteliais que demarcam os lúmens. As células luminais do ducto terminal e do lóbulo produzem leite, porém aquelas que revestem o grande sistema ductal não [79].

Alterações hormonais durante a gravidez dão início a uma fase cíclica de desenvolvimento, na qual há a transição de uma morfologia predominante de ductos para uma

morfologia de glândula lóbulo-alveolar (Figura 04) devido à ação de vários hormônios como estrógenos, progesterona, prolactina e lactogênio placentário [81].

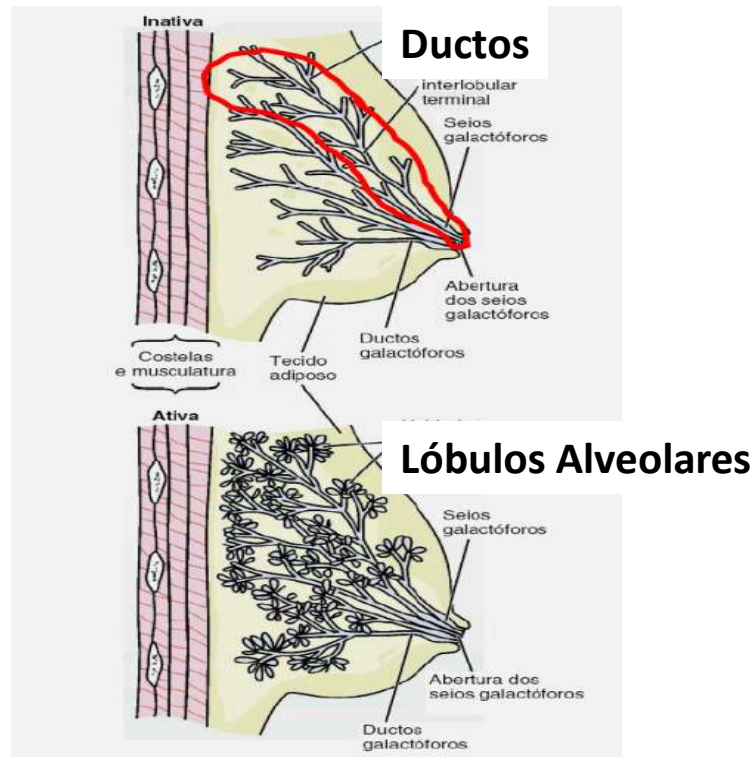


Figura 05: Glândula mamária inativa e ativa  
Fonte: <http://dc307.4shared.com/doc/JMVjM-tH/preview.html>

Durante a lactação, o leite é produzido pelas células epiteliais dos alvéolos e ao final dessa fase, grande parte dos alvéolos desenvolvidos durante a gestação degenera, sofrem apoptose e são eliminados por ação de macrófagos [81]. Ao se aproximar da menopausa, o tecido mamário sofre um processo de atrofia e é substituído progressivamente por tecido adiposo, até se constituir quase exclusivamente por esse tecido e resquícios de tecido glandular na fase de pós- menopausa [81]. A transição entre essas fases é sinalizada e controlada pela ação de hormônios, principalmente o estrogênio. Entretanto, pouco se sabe sobre como as células epiteliais e estromais são preparadas para responder a esses sinais e seus efeitos sobre a saúde no início da vida e nas doenças na vida adulta, como a susceptibilidade ao câncer [82].

## 2.4 CÂNCER DE MAMA

### 2.4.1 Fisiopatologia

Alterações nas estruturas da mama favorecem o desenvolvimento do câncer, que é caracterizado por desregulação da proliferação e apoptose celular, desaparecimento de células mioepiteliais, transformação do epitélio mesenquimal, instabilidade genômica (mutações, deleções, ampliações, rearranjos cromossômicos), perda da organização e compartimentalização [83].

Embora não se conheça exatamente todo o mecanismo causal do câncer de mama, não há dúvida de que a interação entre os fatores genéticos e ambientais exerçam papel fundamental na etiologia e na evolução dos casos [84]. Dados clínicos, epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que o risco de desenvolvimento de câncer de mama esporádico está fortemente relacionado à produção de esteroides sexuais. Condições endócrinas moduladas pela função ovariana, como a menarca precoce, menopausa tardia e gestação, assim como a utilização de estrógenos exógenos, são componentes relevantes do risco de desenvolvimento do câncer de mama [85,86].

O conhecimento dos aspectos morfológicos, moleculares e bioquímicos também tem sido importante no sentido de auxiliar nas estratégias de tratamento local e sistêmico [19,87]. Dentre os fatores clínico patológicos, o tamanho do tumor, o grau tumoral, o estado do envolvimento dos linfonodos regionais e a idade seguem sendo as variáveis de maior impacto no prognóstico do câncer de mama [88–90]. O tipo histopatológico, o grau nuclear, o nível de expressão do receptor HER-2 e do receptor de estrogênio, entre outras variáveis, também contribuem para refinar a classificação dos casos [91,92].

### 2.4.2 Epidemiologia

O câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres, correspondendo a 25% de todos os cânceres [93]. A incidência de câncer de mama varia quase quatro vezes entre as regiões do mundo, com taxas de 27 por 100.000 na África, Oriente Médio e Ásia a 96 por 100.000 na Europa Ocidental [93]. Tal variabilidade deve-se, provavelmente, a diferenças na prevalência dos fatores de risco para doença [94]. A figura 05 mostra que, além de ser o mais incidente, o câncer de mama é também a causa mais comum de morte por neoplasia entre as mulheres [93].

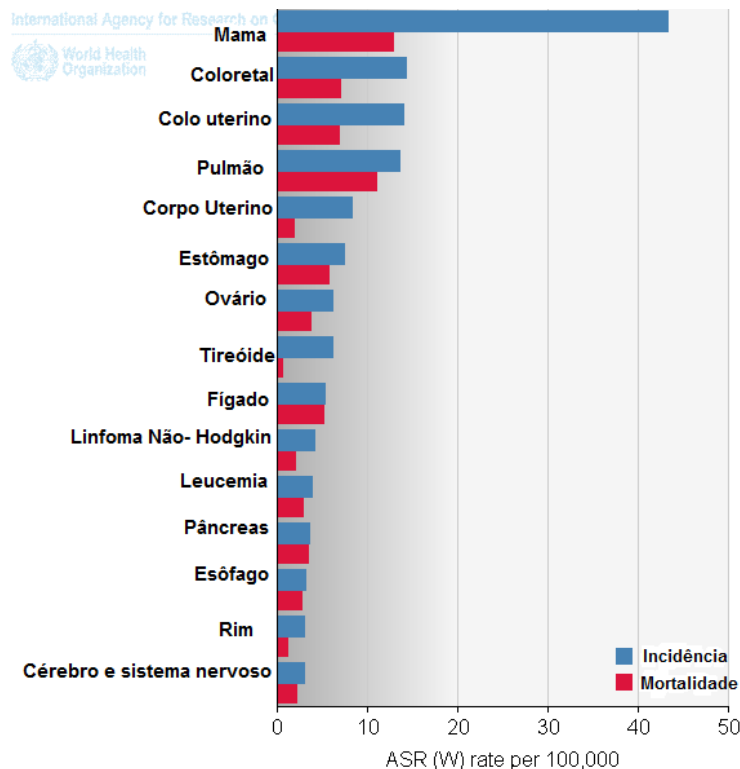


Figura 06: Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes na população feminina mundial em 2012. ASR=Taxa ajustada por idade.  
 Fonte: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx) Acessado em 30 de janeiro de 2014.

Os esforços de implantação de estratégias de rastreamento para detecção precoce do câncer de mama levaram à estabilidade ou declínio das taxas de mortalidade em diversos países [94]. Contudo, dificuldades de tratamento do câncer de mama estão em parte relacionadas com as características pessoais (idade, sexo e raça) e socioeconômicas (renda e escolaridade) e com características relacionadas ao tumor (tipo histológico, tamanho, grau, estadiamento e receptores hormonais) o que torna o câncer de mama uma doença heterogênea. Esta variação é determinada por uma série complexa de características que podem contribuir para um desfecho favorável ou trazer complicações [95].

Sendo o câncer de mama uma doença bastante heterogênea, não é surpreendente que as respostas aos tratamentos também possam variar. Neste sentido, uma busca em construir modelos de predição de evolução clínica e resposta terapêutica têm sido objeto de vários estudos nas últimas décadas [92,96]. Estes modelos contribuem para melhorar a qualidade de vida do paciente e para definições de políticas em saúde [97].

### 2.4.3 Heterogeneidade do câncer de mama

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea de natureza complexa, que pode se apresentar em diferentes formas clínicas e histopatológicas, bem como, por diferenças na pré- e pós-menopausa, nos graus de agressividade tumoral e pelo potencial metastático [98]. O carcinoma mamário apresenta ainda heterogeneidade molecular, em função da expressão diferenciada de receptores de estrogênio e progesterona, receptor de HER2 e de outras moléculas como EGFR, citoqueratimas [99]. Tais diferenças têm servido como base para a classificação da doença em pelo menos quatro subtipos – Luminal A, Luminal B, HER2 e Triplo-Negativo, cada um deles com comportamento biológico distinto e requerendo terapias específicas [100].

#### 2.4.3.1 Heterogeneidade morfológica

As neoplasias de mama têm apresentação variada em parte pela variedade de tecidos envolvidos na gênese das lesões epiteliais, mesenquimais e mioepiteliais, em parte pela composição genética de cada tipo histológico, grau e estadiamento.

O tipo histológico mais frequente é o ductal (75%), seguido pelo carcinoma lobular (15 a 25%) [101]. Entre os tipos especiais, alguns têm comportamento biológico mais favorável em relação ao tipo ductal, como os carcinomas tubular, mucinoso do tipo colóide, cribriforme infiltrativo, secretor e adenocístico, enquanto outros têm comportamento mais agressivo, tais como o metaplásico e o micropapilar invasivo [102].

A graduação histológica (grau histológico) busca estimar o quanto as células neoplásicas se distanciam de um fenótipo normal [103]. A União Internacional Contra o Câncer (UICC) utiliza o sistema de Nottingham para graduação histológica de 1 a 3 de acordo com a formação tubular (porcentagem do câncer composto por estruturas tubulares), o pleomorfismo nuclear (alteração no tamanho das células e uniformidade) e a contagem mitótica (taxa de divisão celular) presente na análise microscópica tumoral [104]. O aumento do grau histológico é associado a piores desfechos clínicos [105].

Além das diferenças quanto ao tipo e grau histológico, o carcinoma de mama pode também apresentar extensão variada. Na mama, os tumores podem ser considerados *in situ*, referindo-se ao câncer no qual as células se mantiveram dentro do local de origem (ducto ou lóbulo), sem invadir o restante do tecido mamário [106], ou invasivos, quando as células tumorais extravasaram as membranas que revestem os ductos e lóbulos, invadindo os tecidos mamários. Os carcinomas mamários invasivos (ductais ou lobulares) apresentam 8 a 9 vezes

maior risco de progressão do que as apresentações *in situ*, sendo tal caracterização fundamental para a definição de prognóstico e seleção terapêutica [101].

A extensão do câncer de mama também é caracterizada pela presença de lesões neoplásicas em linfonodos axilares ou em outros tecidos (metástases à distância). O sistema TNM, proposto pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), classifica a evolução das neoplasias malignas para determinar o melhor tratamento e a sobrevivência dos pacientes [107]. Neste sistema, T categoriza o tamanho do tumor, em centímetros; N indica o número de linfonodos acometidos e M informa se o tumor se estende a outros órgãos à distância [108]. Para fins de estadiamento do câncer de mama, é feita a combinação das categorias TNM (Anexo 1), levando a caracterização de 5 estágios de avanço tumoral (Anexo 2).

#### 2.4.3.2 Heterogeneidade molecular

Estudos de caracterização do perfil de expressão gênica em tumores de mama levaram à proposição de um novo sistema de classificação, baseado na expressão de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), receptor de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER2), e de outros marcadores moleculares, visando melhor personalização dos tratamentos e condutas médicas [105]. De acordo com este sistema, os tumores de mama podem ser de quatro subtipos (figura 06):

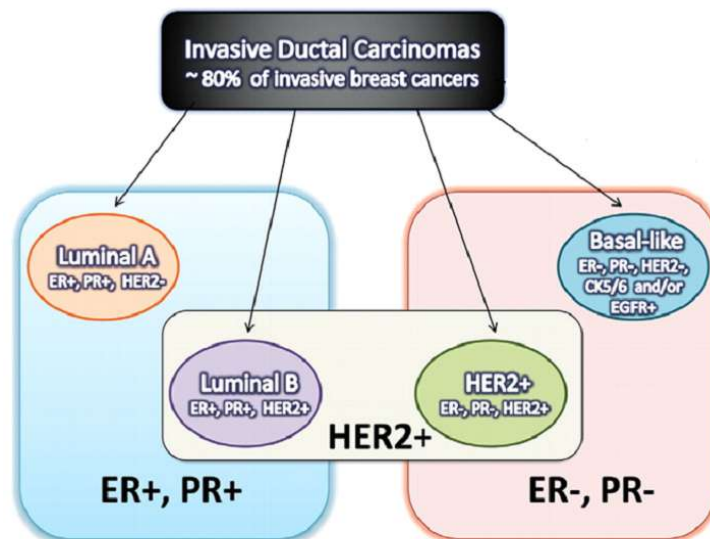


Figura 07: Esquema apresentando os vários subtipos de câncer de mama. Os retângulos azul e rosa mostram os subtipos tumorais com base na expressão dos receptores hormonais (ER = estrogênio e PR=progesterona). No retângulo azul os subtipos com positividade para os receptores hormonais (Luminal A e Luminal B) e no rosa com negatividade (HER2+ e basal). O retângulo cinza central indica a presença de amplificação de HER2 nos subtipos Luminal B e HER2+. (Adaptado de SANDHU *et al.*, 2010).

Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais [98].

Luminal A é o subtipo mais comum, representando 50 a 60% do total de casos e é caracterizado pela expressão de genes ativados por fatores de transcrição que são tipicamente expressos no epitélio luminal dos ductos mamários [109]. Os tumores classificados neste grupo são: lobular *in situ*, CDIS e a maioria dos carcinomas lobular e ductal infiltrante. Apresentam expressão RE, RP, gene linfoma de células B2 (Bcl-2) e citoqueratina CK8/18, ausência da expressão do receptor HER2, baixa taxa de proliferação e baixo grau histológico [110].

Os tumores do subtipo Luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por sua vez esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo [111]. Esse subtipo de tumor corresponde a 10 a 20% dos cânceres de mama e, se comparados ao Luminal A, são mais agressivos, com maior grau histológico e índice proliferativo e pior prognóstico [98].

O subtipo HER2 corresponde a cerca de 15 a 20% dos cânceres de mama e são caracterizados por maior expressão do HER2 e de outros genes associados a via do HER2, com aumento de genes relacionados com a proliferação [112]. Em contrapartida, esses tumores são negativos para RE e RP. Morfologicamente, são altamente proliferativos, 75% têm alto grau histológico e mais de 40% possuem mutações no gene p53 [105].

O subtipo basal representa de 10 a 20% de todos os carcinomas de mama [110]. Este termo foi usado porque este subtipo expressa genes geralmente presentes em células mioepiteliais de mama normal [105]. Clinicamente, esse subtipo é caracterizado por maior frequência em pessoas mais jovens, apresenta maior tamanho tumoral, alto grau histológico e alta frequência de linfonodos positivos. Tumores do subtipo basal tendem a ser carcinoma ductal invasivo com alto índice mitótico e necrose tumoral [105]. Um dos fatores mais importantes é a ausência da expressão de RE, PR e HER2. O subtipo basal tem um pior prognóstico em relação aos tipos Luminal A e B, com maior taxa de recorrência nos primeiros 3 anos, apesar da alta taxa de resposta à quimioterapia [113].

Na prática clínica, a avaliação histopatológica incorporou a caracterização da presença de receptores hormonais e de HER2 por análise imuno-histoquímica em espécimes tumorais, levando a uma adaptação da subclassificação dos tumores de mama com base nos perfis de imunomarcção [114]. Embora esta classificação baseada na análise imuno-histoquímica tenha vantagens práticas para a definição de condutas terapêuticas, reduzindo as dificuldades

operacionais em relação à avaliação de material genético em tumores frescos ou congelados, deve-se observar que tumores Triplo-Negativos abrangem, mas não correspondem necessariamente ao subtipo basal. A definição do subtipo basal requer a avaliação de outros alvos moleculares, incluindo (pelo menos) citoqueratina 5 e 6 e EGFR [115–117].

#### **2.4.4 Estresse oxidativo e câncer de mama**

Em 2006, karihtala e colaboradores avaliaram a associação entre o estresse oxidativo e a carcinogênese mamária, para isto os autores avaliaram a expressão de marcadores de dano oxidativo em lipídeo (4-hidroxinonenal - 4-HNE), proteína (3-nitrotirosina - 3-NITRO) e DNA (8-hidroxideoguanosina - 8-OHdG) em 12 amostras parafinadas de hiperplasia benigna, em 26 tumores *in situ* e 63 tumores invasivos (estadiamento I) de mama. Neste estudo, os autores observaram que os carcinomas invasivos apresentam maior dano aos lipídeos, proteínas e DNA quando comparada com as lesões *in situ* e as hiperplasias. Foi observado também que a expressão de 3-NITRO está associada com a expressão de 4-HNE e 8-OHdG nos tumores invasivos, sugerindo que durante a progressão da carcinogênese mamária há um aumento de dano oxidativo tanto nos lipídeos, proteína e DNA, que é mais marcante nos tumores mais agressivos [118].

Resultados semelhantes foram encontrados por Curtis e colaboradores (2010), que também verificaram a influência de dano oxidativo na progressão do câncer de mama. Para tal, os autores avaliaram a expressão de 8-OHdG e 3-Nitro em espécimes parafinadas de tecido normal de mama e tecido tumoral com hiperplasia benigna, carcinoma ductal *in situ* e invasivo. Os autores avaliaram a presença ou ausência de imunomarcagem e observaram que no tecido normal não havia imunomarcagem para o 8-OHdG nem para o 3-Nitro. Com relação ao tecido tumoral, foi encontrado um aumento da imunomarcagem para 8-OHdG e 3-Nitro tanto em hiperplasia benigna, carcinoma ductal *in situ* e invasivo quando comparado com o tecido normal, entretanto não foi encontrada diferença significativa entre a expressão desses marcadores nos tecidos tumorais e no tecido normal [119].

Ainda na finalidade de esclarecer a influência do estresse oxidativo na carcinogênese mamária, Karihtala e colaboradores (2011), realizaram outro estudo avaliando apenas a expressão de 8-OHdG e 4-HNE em amostras parafinadas de 31 hiperplasias ductais habituais, 25 hiperplasias ductais atípicas, 30 carcinomas ductais *in situ* e 133 carcinomas invasivos. Os casos foram avaliados quando a ausência ou presença de imunomarcagem e relacionados com



as características histológicas do câncer de mama. Foi observado pelos autores a presença de imunomarcação para o 8-OHdG e 4-HNE tanto em lesões malignas como em benignas, e que nos tumores invasivos tem uma menor expressão de 8-OHdG e uma maior expressão de 3-Nitro. Com relação as características histopatológicas não foram observadas diferença significativa na distribuição para ambos os marcadores. Foi sugerido pelos autores que a baixa expressão de 8-OHdG em tumores invasivos pode estar relacionado com a indução de enzimas de reparo no DNA e que a peroxidação lipídica observado pelo 4-HNE está aumentada durante a carcinogênese [75].

Em um estudo mais recente realizado por Balestrieri e colaboradores (2012), avaliaram a produção de  $\cdot\text{NO}$  e de produtos da peroxidação lipídica (MDA e 4-HNE) no tecido normal adjacente ao fibroadenoma, ao carcinoma ductal hiperplásico e ao carcinoma ductal invasivo de mulheres com câncer de mama. Os autores observaram um aumento gradativo na produção de  $\cdot\text{NO}$  e de MDA e 4-HNE entre o tecido adjacente do fibroadenoma e do carcinoma ductal invasivo, sugerindo desta forma, uma influência da peroxidação lipídica na progressão do câncer [120].

Além desses estudos em amostras parafinadas de neoplasias mamárias que buscaram compreender a influência do dano oxidativo na carcinogênese do câncer de mama outros estudos buscam entender como o estresse oxidativo influencia na evolução clínica dessa doença.

Nakamura e colaboradores (2006) avaliaram se a expressão de 3-Nitro em 113 espécimes parafinadas de carcinoma ductal invasivo de mama está relacionada com as características histopatológicas com valor prognostica e se este marcador influencia na evolução clínica do câncer de mama. Os autores observaram que a expressão de 3-Nitro está associada apenas com a presença de metástase linfonodal e VEGF, e que a baixa expressão de 3-Nitro está associada com uma alta sobrevida global e livre de doença em pacientes com câncer de mama, sugerindo que alta expressão de 3-Nitro pode servir como fator prognostico significativo para a sobrevida a longo prazo das pacientes com câncer de mama [121].

Com o intuito de compara níveis séricos de dano oxidativo com sua expressão tecidual, Sova e colaboradores (2010), verificaram que existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de 8-OHdG e sua expressão tecidual em 140 pacientes com carcinoma ductais de mama. Os autores observaram que níveis baixos de 8-OHdG no soro estão associados com

invasão dos vasos linfáticos e status linfonodal I e II, e que a imunomarcção negativo de 8-OHdG associada apenas com status linfonodal positivo. Com relação a sobrevida das pacientes com câncer de mama, aquelas que não expressão 8-OHdG tem pior sobrevida quando comparada com as pacientes que expressão tal marcador, sugerindo desta forma que o a imunomarcção do 8-OHdG pode ser um fator prognostico para pacientes com câncer de mama [122].

Em seguida um estudo realizado por Karihtala e colaboradores (2011) em espécimes parafinadas de câncer de mama, avaliaram a expressão de 8-OHdG entre 37 tumores Triplo-negativos e 49 luminais, e analisaram se esse marcador apresenta valor preditivo para o câncer de mama. Os tumores Triplos-negativos foram subclassificados em tumores basais e não basais de acordo com a expressão de citoqueratinas e EGFR. Os autores observaram uma menor expressão de 8-OHdG entre os Triplos-negativos quando comparado com os tumores luminais. Ao analisar apenas o grupo dos Triplo-negativos foi encontrado uma maior expressão de 8-OHdG entre os subtipos basais em relação aos não basais. No entanto, não foi encontrado diferença na sobrevida da pacientes que apresentavam tumores Triplo-negativos basais ou não basais [123].

Embora os resultados aqui apresentados analisem marcadores de danos oxidativos tanto na carcinogênese mamária como evolução da doença, ainda há poucos relatos na literatura de como essas alterações oxidativas estão presentes no microambiente tumoral das neoplasias mamárias e como essas alterações estão relacionadas com as características histopatológicas com valor prognostico quando a evolução clínica do câncer de mama.

### **3 JUSTIFICATIVA**

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, as taxas de mortalidade no Brasil são elevadas provavelmente porque a doença é diagnosticada em estágios avançados.

O carcinoma mamário é uma doença complexa que engloba diversas alterações genéticas e bioquímicas, além de mudanças no microambiente tumoral. Tais mudanças podem estar relacionadas com o estresse oxidativo, em decorrência de um desbalanço entre a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ineficiência das defesas antioxidantes. O estresse oxidativo contribui para a carcinogênese através da mutação do DNA ou de danos estruturais em lipídios intracelulares e proteínas.

Apesar das evidências a respeito do efeito do estresse oxidativo no câncer de mama, caracterizando o processo de carcinogênese, na literatura são raros os estudos encontrados que procuram investigar a existência de dano oxidativo em tecido mamário humano, bem como sua associação com os subtipos moleculares do câncer mama. Desta forma, pretendemos caracterizar o perfil oxidativo no ambiente tumoral de carcinomas mamários, e avaliar sua relação com as características moleculares do câncer de mama.

## **4 OBJETIVO**

### **4.1 PRINCIPAL**

Caracterizar, através de imuno-histoquímica, o perfil oxidativo do microambiente tumoral de neoplasias mamárias e avaliar a associação com características histopatológicas do câncer de mama.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

- Analisar o dano oxidativo em tumores de carcinoma mamário ductal invasivo, avaliando a ocorrência de peroxidação lipídica, nitração de proteínas e de oxidação de DNA.
- Avaliar a associação entre os níveis de dano oxidativo e características histopatológicas morfológicas e moleculares de valor prognóstico quanto à evolução clínica do câncer de mama.

## **5 MATERIAS E MÉTODOS**

### **5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo observacional analítico seccional envolvendo espécimes tumorais provenientes de uma coorte hospitalar de mulheres com câncer de mama unilateral e não metastático, que foram submetidas à cirurgia curativa como primeira abordagem terapêutica.

### **5.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO**

#### **5.2.1 - Critérios de inclusão**

As participantes da coorte foram admitidas no Hospital do Câncer III do Instituto Nacional de Câncer (HC-III/INCA), no período compreendido entre fevereiro de 2009 a março de 2013. Foram consideradas elegíveis para o estudo mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama unilateral, sem metástase à distância, que receberam indicação inicial de tratamento cirúrgico com intenção curativa, que aceitaram participar da investigação e conseguiram responder às perguntas durante entrevista inicial. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (Anexo III) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP/FIOCRUZ (CAAE: 31108414.6.0000.5240; Anexo IV).

#### **5.2.2 - Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo as mulheres com qualquer malignidade prévia ou concomitante, que apresentaram metástase à distância antes do início do tratamento, com diagnóstico histopatológico pós-cirúrgico de sarcoma mamário, que solicitaram desligamento da participação no estudo ou abandonaram o tratamento.

#### **5.2.3 Caracterização histopatológica**

A caracterização histopatológica dos tumores de mama foi realizada por médico patologista, com base na análise microscópica de cortes da peça cirúrgica, de acordo com a rotina de investigação diagnóstica do Serviço de Patologia Clínica do INCA. Os laudos

histopatológicos foram registrados em prontuário eletrônico e consultados para obtenção dos parâmetros avaliados.

A classificação histológica foi baseada na 3ª edição do WHO Classification of Tumours (2013) e no sistema de graduação histológica de Ellton e Ellis (1991) [124].

A subclassificação biológica dos tumores de mama foi realizada com base nos resultados de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, fornecidos pelo Serviço de Patologia Clínica do INCA, seguindo o modelo proposto por Huober *et al.*, 2010, conforme descrição abaixo:

- Luminal A: tumores RE+, RP+, HER2 -;
- Luminal B: tumores RE+, RP-, HER2- ou RE+, RP-, HER2+ ou RE-, RP+, HER2- ou RE+, RP+, HER2+;
- tipo HER2: tumores RE-, RP+, HER2+ ou RE-, RP-, HER2+;
- Triplo negativo: RE-, RP-, HER2-.

Quando a positividade para HER-2 não foi possível, foi considerada indeterminada, o resultado do laudo final foi dado por análise de hibridização *in situ* fluorescente (FISH). A análise de FISH foi feita pelo kit HER2 FISH DAKO pharmDx, código K5331 (Dako, EUA). A presença de amplificação gênica ocorreu quando a relação HER2/cr17 foi superior a 2,2. (ASCO/CAP Guideline recommendations for HER2, 2007).

O estadiamento foi feito de acordo com o sistema TNM [107], considerando a classificação de tamanho tumoral e de grau de envolvimento linfonodal obtidos nos laudos histopatológicos. A presença de metástases em linfonodos axilares foi avaliada pelo exame histopatológico de peça cirúrgica obtida durante pesquisa de linfonodo sentinela e/ou durante linfadenectomia axilar.

### 5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

#### 5.3.1 Logística de seleção de espécimes tumorais e preparo de lâminas

As amostras de tecido mamário retiradas na cirurgia foram fixadas em formalina tamponada e incluídas em blocos de parafina. A partir de cada bloco foi feito um recorte em lâmina silanizada, o qual foi corado por hematoxilina-eosina, para visualização das estruturas teciduais de interesse e avaliação histopatológica.

A escolha dos blocos para as análises imuno-histoquímicas e a revisão histopatológica de todas as lâminas foi realizada com ajuda de uma patologista especialista. Foram

priorizados os blocos com maior proporção de tecido mamário comprometido pelo carcinoma em relação à presença de ductos normais. Em seguida os blocos selecionados foram processados como descrito previamente [125].

As amostras tumorais selecionadas foram cortadas em secções de 3µm de espessura de tecido e montadas em lâminas de vidro com 3-aminopropiltriethoxi-silano (Sigma Chemical Co, St Louis, MO USA). As lâminas foram desparafinadas em estufa a 56°C e em banhos de xilol, e reidratadas em um sistema de graduação em série de etanol seguido por lavagens em água corrente.

### **5.3.2 Etapa de padronização dos ensaios de imunomarcção**

Com o objetivo de verificar a sensibilidade dos anticorpos 4-HNE (ab46546 - abcan discover more), 3-Nitro (sc-32757 - Santa Cruz Biotechnologies) e 8-OHdG (N45.1- ab48508 - abcan discover more), a técnica de imuno-histoquímica foi padronizada em casos de adenocarcinoma de cólon (sugerido como controle positivo pelos fabricantes para os três anticorpos) e em casos de câncer de mama. Inicialmente, foi realizada uma curva de diluição para cada anticorpo, sendo avaliados dois tampões de recuperação antigênica diferentes: um tampão ácido (citrato 10 mM, pH 6,0) e um tampão básico (tampão Tris-EDTA – tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 9,0). Para cada anticorpo, foi identificada a maior diluição capaz de permitir imunomarcção tanto em amostras de adenocarcinoma de colón quanto em amostras de carcinoma mamário, sendo selecionado o tampão de incubação que permitiu melhor visualização das imunomarcações. Desta forma, para o 4-HNE, a diluição escolhida foi 1:1500 com o tampão tris-EDTA; para o 3-NITRO, a diluição foi de 1:800 com tampão citrato e para o 8-OHdG, a diluição foi de 1:30000 com tampão tris-EDTA.

A especificidade dos anticorpos foi avaliada pelo local de marcação do anticorpo na estrutura celular do tecido analisado. Para todos os anticorpos obtivemos especificidade na marcação, uma vez que, para o 4-HNE e 3-NITRO obtivemos marcação apenas citoplasmática e para o 8-OHdG apenas marcação nuclear.

### **5.3.3 Técnica de Imuno-histoquímica**

A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor, com as amostras imersas em tampão de recuperação. Terminado o tempo de incubação (30 minutos), as lâminas foram incubadas neste mesmo tampão para resfriamento por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de mais 10 minutos adicionais em lavagem em água corrente. Em seguida, foi realizada a marcação dos limites dos cortes com caneta hidrofóbica (DAKO lab. Inc., New

York, NY, USA) e o corte foi incubado durante 5 minutos com TBST (tampão TBS, pH 7,6 contendo Tween 20 0,1% (DAKO)). Posteriormente, os cortes foram cobertos com a solução de bloqueio de peroxidase contida no kit por 5 minutos *Novolink Polymer Detection Systems* (Leica Microsystems). As etapas seguintes foram a lavagem com água destilada e novamente incubação com TBST, sendo 3 banhos de 5 minutos cada.

Os cortes foram, então, incubados por 5 minutos com a solução de bloqueio de proteína contida no kit *Novolink Polymer* (Leica Biosystems, St Louis, EUA), e posteriormente, incubados com cada anticorpo primário, diluído em solução diluidora de anticorpo (DAKO), durante um período de 16 a 20 horas em temperatura de 2 a 8°C.

No dia seguinte, os cortes foram lavados com água destilada e incubados com TBST. Os cortes em seguida foram cobertos com a solução de desbloqueio pós-primário contida no kit *Novolink Polymer*, durante 30 minutos. O processo de lavagem foi repetido e os cortes foram incubados com a solução de polímero contida no kit *Novolink Polymer*, durante 30 minutos. Novamente, o processo de lavagem foi repetido e, finalmente, os cortes foram revelados usando DAB (diaminobenzidine). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina, por 15 segundos. As lâminas coradas foram lavadas em água corrente, imersas em soluções de álcool e de xilol e, em seguida, cobertas com lamínulas.

Durante a realização de cada experimento foram incluídas amostras de controle positivo, controle negativo (ausência de anticorpo primário) e um caso de mama normal.

#### **5.3.4 Estudo histomorfométrico**

A obtenção dos resultados utilizados para análise estatística foi feita através da observação microscópica (microscopia ótica) dos cortes dos tumores de mama, com auxílio de uma patologista da DIPAT/INCA. Para cada lâmina foi analisada toda a região tumoral no maior aumento (400x).

As reações de imunomarcção dos 3 marcadores de dano oxidativo nas amostras de carcinoma mamário foram quantificadas de acordo com Pasanen et al. (2012)[126], levando em consideração dois parâmetros: extensão (percentual de células que apresentavam reação positiva) e intensidade da imunomarcção. No que se refere ao percentual de células coradas, os casos foram graduados de 0-4, sendo que o ponto de corte para a negatividade foi fixado em 5% das células coradas e a graduação atribuída foi 0 (zero). Os casos positivos foram divididos em quatro grupos, de modo que a presença de positividade em 6-25% das células



permitiu classificar o caso como grau 1, de 26-50% como grau 2, de 51-75% como grau 3, e de 76-100% como grau 4. A intensidade de coloração foi graduada entre 0-3, sendo 0 para negativo, 1 para intensidade fraca, 2 para moderada e 3 para forte. Em seguida, os dados foram dicotomizados em: extensão restrita (grau 0-3) ou ampla (grau 4) e intensidade fraca (graus 0-1) ou forte (graus 2-3) [126]. Finalmente, o produto (grau de extensão) x (grau de intensidade) foi considerado como escore global da expressão de cada marcador de dano oxidativo. Dentre os escores possíveis (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12), a expressão foi classificada como baixo (escores 0-2), intermediário (escores 3-6) ou alto (escores 8-12).

#### 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, foi realizado um estudo descritivo da população da coorte. Todas as informações clínicas e histopatológicas foram categorizadas e apresentadas como números, percentuais ou frequências relativas.

Foi realizado um estudo descritivo das análises de imuno-histoquímica para marcadores de dano oxidativo. A avaliação de associações entre as variáveis histopatológica e moleculares com os dados de dano oxidativo foi realizada através do teste de chi-quadrado ou de Fisher, considerando o p-valor com nível de significância de 5%.

Os ajustes nos cálculos de razão de chance pelas variáveis de interferência foram realizados por regressão binária. Neste estudo, o nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados com valor de p menor do que 0,05 foram destacados em negrito.

Todas as análises estatísticas foram conduzidas com o software SPSS 20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois) ou GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS

A Figura 06 apresenta o fluxograma de formação da coorte e a disponibilidade de amostras tumorais parafinadas para o estudo. As pacientes foram recrutadas quando admitidas para cirurgia de ressecção tumoral com finalidade diagnóstica ou terapêutica, mas a população da coorte só foi definida após análise histopatológica do material tumoral e revisão dos critérios de elegibilidade.

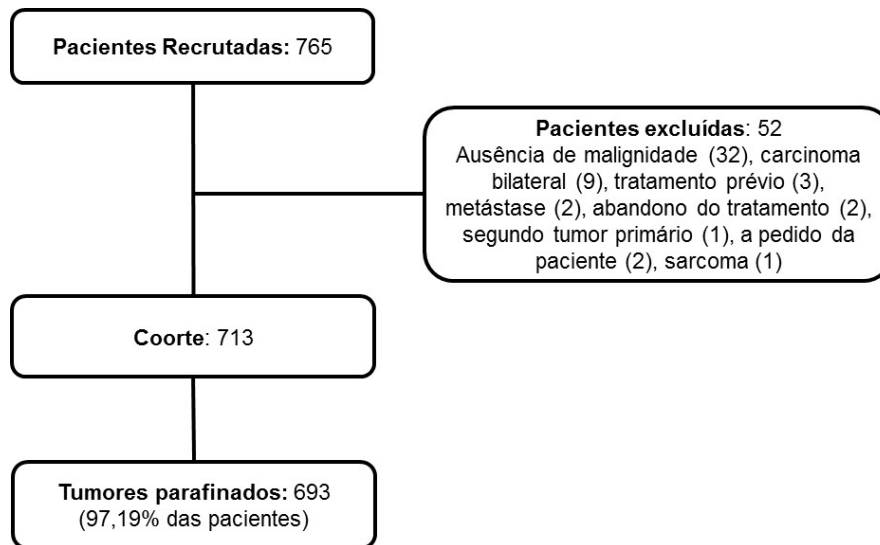


Figura 08: Fluxograma de formação da coorte prospectiva de câncer de mama

Os casos confirmados de carcinoma mamário com espécimes tumorais disponíveis foram avaliados quanto às características clínicas e histopatológicas (Tabela 01). Houve ampla distribuição de idades (24 - 91 anos), com mediana de 58 anos, estando a maioria das pacientes (aproximadamente 75%) em pós-menopausa. Com relação à classificação histológica, os tumores foram predominantemente dos tipos ductal (90,6%) ou lobular (6,0%), sendo a maioria de caráter invasivo (90,1%). A maior parte dos casos (mais de 80%) apresentava-se em estadiamentos iniciais ( $\leq$  II), embora com altos graus histológicos (G2 ou G3). Os tumores também foram avaliados quanto à positividade para os receptores de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e HER2, para fins de caracterização dos subtipos tumorais. A maioria dos casos (aproximadamente 60%) apresentou o subtipo Luminal A, que corresponde ao perfil molecular de melhor prognóstico.

**Tabela 01: Características clínicas e histopatológicas das pacientes de câncer de mama (N = 693)**

Características	N	%	Características	N	%
<b>Idade ao diagnóstico (anos)</b>			<b>Grau (G)</b>		
24 – 34 anos	13	1,9	G1	82	12,8
35 – 44 anos	81	11,7	G2	254	39,7
45 – 54 anos	178	25,7	G3	303	47,4
55 – 64 anos	200	28,9	Desconhecido	54	
65 anos ou mais	221	31,9			
<b>Status Menopausal</b>			<b>Status RE</b>		
Pré-menopausa	173	25,3	Negativo	107	16
Pós-menopausa	510	74,7	Positivo	562	84
Desconhecido	10		Desconhecido	24	
<b>Tipo Histológico</b>			<b>Status RP</b>		
Ductal Invasivo	585	84,5	Negativo	191	28,6
Lobular Invasivo	39	5,6	Positivo	477	71,4
Ductal <i>in situ</i>	42	6,1	Desconhecido	25	
Lobular <i>in situ</i>	3	0,4	<b>Status HER-2</b>		
Outros	23	3,3	Negativo	501	80,9
Desconhecido	1		Positivo	101	16,3
			Indeterminado	17	2,7
			Desconhecido	74	
<b>Estadiamento</b>			<b>Subtipo tumoral</b>		
0	44	6,5	Luminal A	386	63,3
I	217	31,9	Luminal B	128	21,0
II	307	45,1	<i>HER2-like</i>	36	5,9
III	112	16,5	Tripló-Negativo	60	9,8
Desconhecido	13		Desconhecido	83	

Abreviações: RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; HER2: Receptor do fator de crescimento epidermal humano;

Para a caracterização do perfil de dano oxidativo em tumores mamários, foram avaliados apenas os casos de carcinoma ductal invasivo (N = 585), sendo as amostras selecionadas com base na disponibilidade de cada subtipo tumoral. Assim, foram avaliados todos os casos disponíveis dos subtipos *HER2-like* (N = 34) e Tripló-Negativo (N = 55), bem como os primeiros casos de tumores dos tipos Luminal A (N = 106) e Luminal B (N = 105), totalizando uma amostra de 300 pacientes.

## 6.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MARCADORES DE DANO OXIDATIVO NOS TUMORES DE MAMA.

Os ensaios de imuno-histoquímica dos marcadores de peroxidação lipídica (4-HNE), de oxidação proteica (3-NITRO) e de oxidação de DNA (8-OHdG) incluíram um controle negativo (amostra de câncer de mama na ausência de anticorpo primário), um controle positivo (amostra de adenocarcinoma de cólon), amostras de carcinoma mamário, e uma amostra de mama normal (mama contralateral de paciente com câncer de mama, sem lesões benignas ou malignas). O perfil de imunomarcção para cada anticorpo pôde ser determinado em 100% das amostras de carcinoma mamário avaliadas.

As Figuras 07, 08 e 09 ilustram, respectivamente, imagens representativas do padrão de imunomarcção dos anticorpos 4-HNE, 3-NITRO e 8-OHdG nas diluições selecionadas. Cada figura apresenta painéis com os diferentes tecidos avaliados, indicando a seletividade da imunomarcção nas regiões celulares afetadas: marcação citoplasmática para 4-HNE e 3-NITRO, e marcação nuclear para 8-OHdG. As regiões de estroma de mama normal, de câncer de mama e de câncer de cólon foram negativas para todas as reações de imunomarcção.

Os tecidos mamários (ductos e lóbulos) da amostra de mama normal também foram negativos para 4-HNE e 3-NITRO, apresentando reação positiva apenas para o 8-OHdG. Contudo, em algumas amostras de câncer de mama que apresentavam segmentos adjacentes não afetados por neoplasias, houve imunomarcção nos tecidos mamários não neoplásicos para os três marcadores avaliados (resultados não mostrados). Entretanto, o padrão de imunomarcção dos tecidos mamários não neoplásicos não pôde ser adequadamente avaliado em função da ausência de tecido adjacente na maioria das amostras.

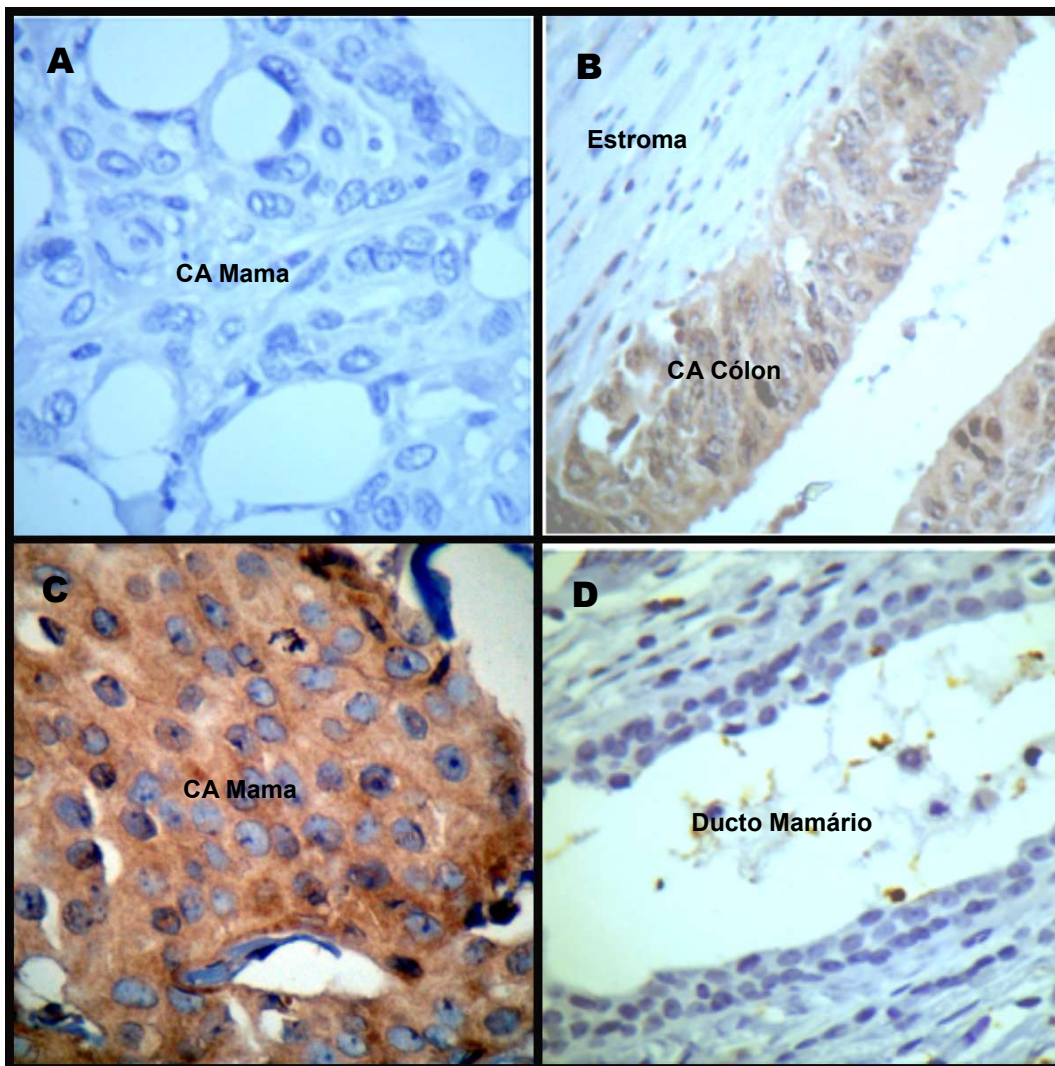


Figura 09: Padrão de imunomarcção do anticorpo 4-HNE na diluição de 1:1500, representativo de n=300. Os painéis correspondem a fotografias de lâminas dos diferentes tecidos analisados visualizados em microscópio ótico com aumento de 400x. A: câncer de mama na ausência de anticorpo primário (controle negativo); B: adenocarcinoma de cólon com imunomarcção citoplasmática para 4-HNE (controle positivo), a região de estroma não apresenta imunomarcção; C: câncer de mama com imunomarcção citoplasmática para 4-HNE; D: mama normal (ducto mamário e estroma) sem imunomarcção para 4-HNE.

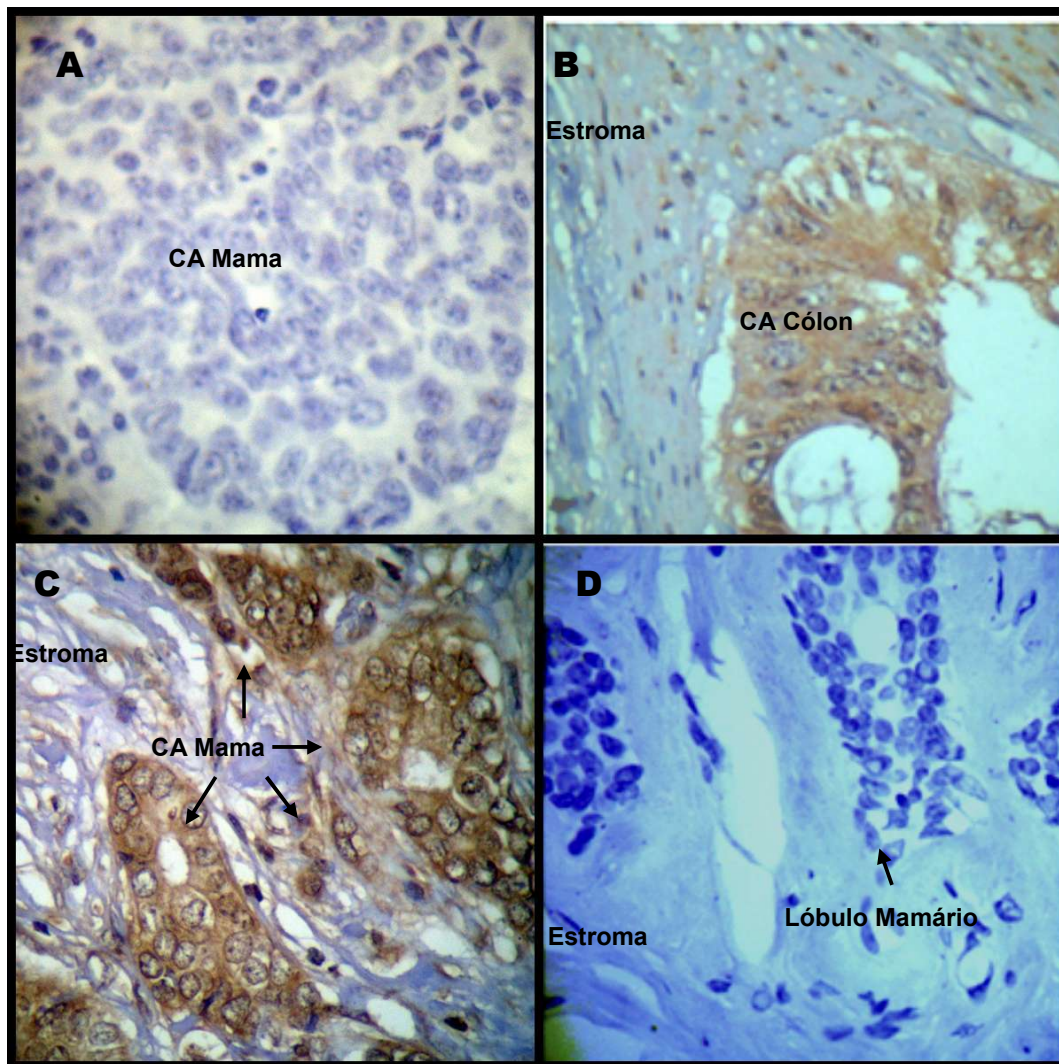


Figura 10: Padrão de imunomarcção do anticorpo 3-Nitro na diluição de 1:800, representativo de n=300. Os painéis correspondem a fotografias de lâminas dos diferentes tecidos analisados visualizados em microscópio ótico com aumento de 400x. A: câncer de mama na ausência de anticorpo primário (controle negativo); B: adenocarcinoma de cólon com imunomarcção citoplasmática para 3-Nitro (controle positivo), a região de estroma não apresenta imunomarcção; C: câncer de mama com imunomarcção citoplasmática para 3-Nitro; D: mama normal (lóbulo mamário e estroma) sem imunomarcção para 3-Nitro.

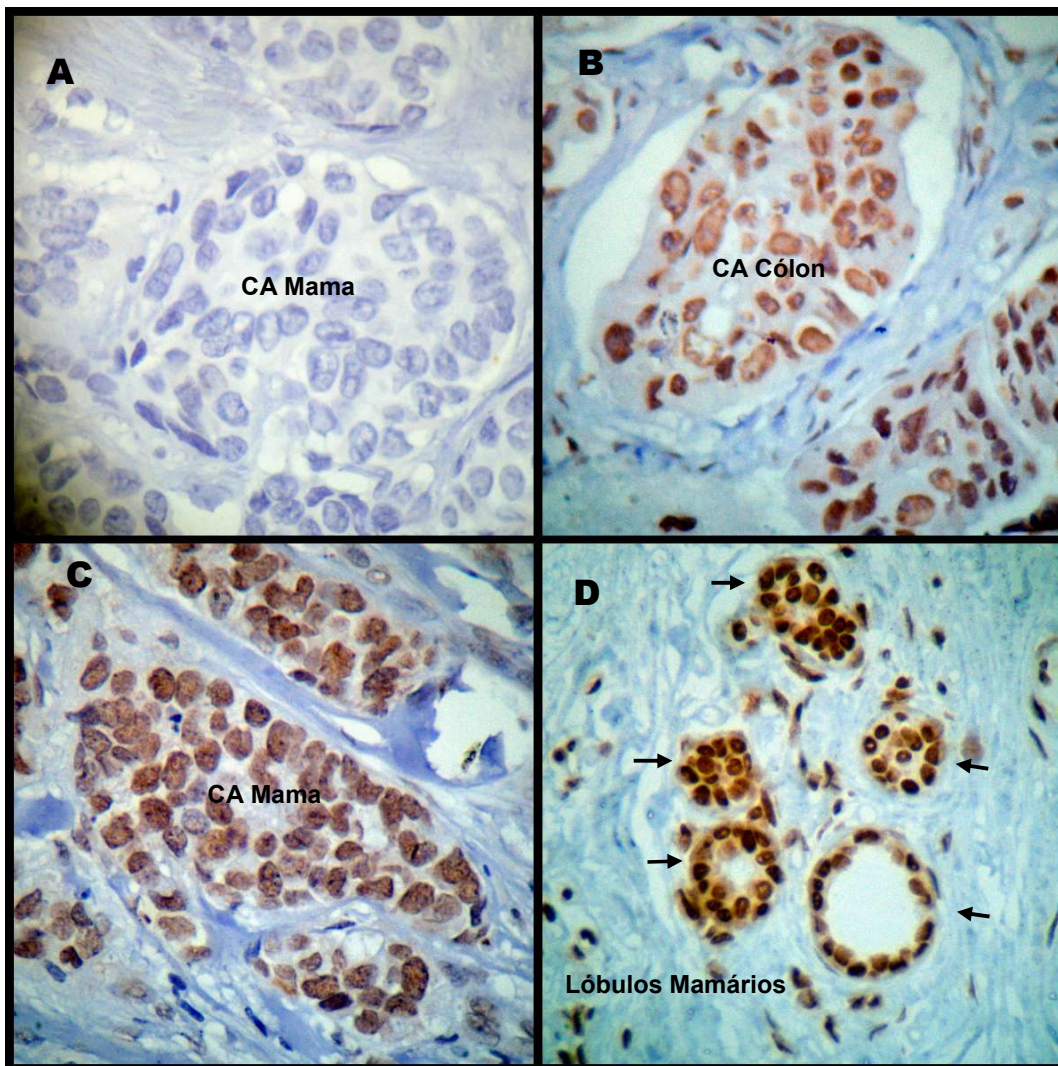


Figura 11: Padrão de imunomarcção do anticorpo 8-OHdG na diluição de 1:30000, representativo de n=300. Os painéis correspondem a fotografias de lâminas dos diferentes tecidos analisados visualizados em microscópio ótico com aumento de 400x. A: câncer de mama na ausência de anticorpo primário (controle negativo); B: adenocarcinoma de cólon com imunomarcção nuclear para 8-OHdG (controle positivo); C: câncer de mama com imunomarcção nuclear para 8-OHdG, a região de estroma não apresenta imunomarcção; D: mama normal (lóbulos mamários) com imunomarcção nuclear para 8-OHdG, a região de estroma não apresenta imunomarcção

Os casos de câncer de mama invasivo apresentaram diferentes perfis de expressão dos marcadores de dano oxidativo. A Figura 10 mostra o histograma de distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore de imunomarcção para os três marcadores de dano oxidativo nas amostras de câncer de mama.

Com relação à avaliação de extensão, a imunomarcção para o 4-HNE apresentou pouca variabilidade entre as lâminas analisadas, com 77,7% dos casos de câncer de mama apresentando ampla extensão, ou seja, mais de 75% de células tumorais imunomarcadas (grau 4), e nenhum caso apresentando extensão inferior ou igual a 25% (graus 0-1). Para os demais anticorpos, houve maior variabilidade quanto à extensão de imunomarcção, com observação

de todos os graus (0-4) entre as amostras analisadas, embora o perfil de ampla extensão (grau 4) tenha sido predominante (57% dos casos para 3-Nitro e 46,7% para o 8-OHdG).

Quanto à intensidade, houve grande predomínio de imunomarcação forte (graus 2-3) entre as amostras de câncer de mama para os três anticorpos avaliados (83,3% dos casos para o 4-HNE, 72,7% para o 3-NITRO, e 87% para o 8-OhdG). Além disso, com relação ao 4-HNE, nenhuma das amostras analisadas apresentou ausência de imunomarcação (grau 0).

Com relação ao escore, houve um predomínio de escore alto (8-12) entre as amostras de carcinoma mamário para os três anticorpos avaliados (73,3% para o 4-HNE, 57,7% para 3-Nitro e 54% para 8-OHdG).

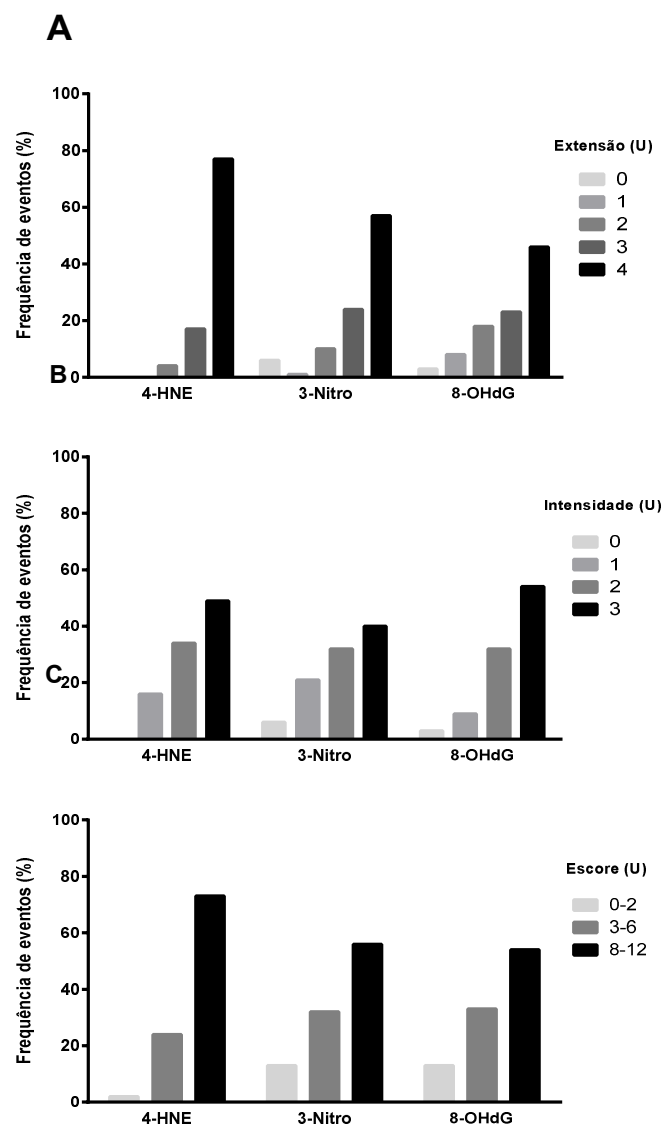


Figura 12: Histogramas de distribuição dos graus de extensão (0-4), intensidade (0-3) e escore (0-12) das reações de imunomarcação dos indicadores de dano oxidativo (4-HNE, 3-Nitro e 8-OHdG) entre amostras de câncer de mama invasivo. A: Distribuição dos graus de extensão; B: Distribuição dos graus de intensidade; C: Distribuição dos graus do escore.



Em seguida, o perfil de expressão dos três indicadores de dano oxidativo foi avaliado em função das características morfológicas do tumor (tamanho e grau), categorizadas de acordo com o valor prognóstico esperado, e em função dos subtipos tumorais previamente selecionados. As Figuras 11, 12 e 13, mostram, respectivamente, a proporção dos perfis de expressão de 4-HNE, 3-Nitro e 8-OHdG, definidos de acordo com a extensão (restrita ou ampla), a intensidade (fraca ou forte) e o escore final (baixo, intermediário ou alto) das imunomarcações.

Com relação aos indicadores 4-HNE e 3-NITRO, os resultados não indicam diferença significativa dos padrões de expressão em função do tamanho, do grau ou dos subtipos tumorais das amostras analisadas (Figuras 12 e 13, respectivamente).

Com relação ao 8-OHdG, observou-se significativa redução da extensão e da intensidade da imunomarcação entre tumores maiores do que 2 cm, de alto grau histológico (G3) ou classificados como Triplo-Negativos, embora a perda de extensão tenha sido mais pronunciada do que a perda da intensidade. Como consequência, observou-se predomínio de escores baixos ou intermediários nestes grupos, enquanto os grupos de referência apresentaram maior proporção de escore alto (aproximadamente 70% entre tumores < 2 cm ou de grau histológico G1-G2, ou 55% a 70% entre tumores dos subtipos luminais ou HER2-like). Dentre as variáveis histopatológicas, o subtipo tumoral parece ter maior influência sobre a expressão de 8-OHdG. A proporção de tumores do subtipo Triplo-Negativo com ampla extensão de imunomarcação (21,8%) foi menos da metade da observada para os demais subtipos tumorais (52,2%), resultando em redução da proporção de casos com alto escore de expressão (de 58,8% para 34,5%) e aumento de casos com baixa expressão (de 9,4% para 25,5%), quando comparados aos demais subtipos tumorais.

Para estimar o efeito independente das variáveis de tamanho, grau e subtipo tumoral sobre a expressão de 8-OHdG, seu impacto sobre os parâmetros de extensão e intensidade e sobre o escore final de imunomarcação foi avaliado em modelos de regressão logística. Com relação à intensidade, a análise multivariada não indicou perda significativa associada às variáveis subtipo Triplo-Negativo ( $OR_{ajustado} = 1,97$ ;  $IC95\% = 0,9 - 4,3$ ), tamanho tumoral maior do que 2 cm (ou alto grau histológico). Os resultados em relação à extensão e ao escore final da imunomarcação de 8-OHdG são apresentados na Tabela 02. Com relação à extensão, as três variáveis analisadas em conjunto demonstraram efeito independente de redução da expressão tumoral de 8-OHdG. Com relação ao escore final, apenas o subtipo Triplo-

Negativo e o tamanho tumoral superior a 2 cm mantiveram efeito independente. Após estratificação das amostras com base no subtipo tumoral, observa-se significativa redução da extensão de imunomarcção de 8-OHdG apenas para tumores Luminais ou HER2-like maiores do que 2 cm. Entre os tumores Triplo-Negativos, as variáveis de tamanho e grau não apresentaram efeito independente significativo de redução da expressão de 8-OHdG. Em conjunto, os resultados sugerem que o principal determinante do efeito de redução de expressão tumoral de 8-OHdG seja o subtipo Triplo-Negativo, sugerindo que tais tumores sejam menos sensíveis a danos oxidativos ao DNA.

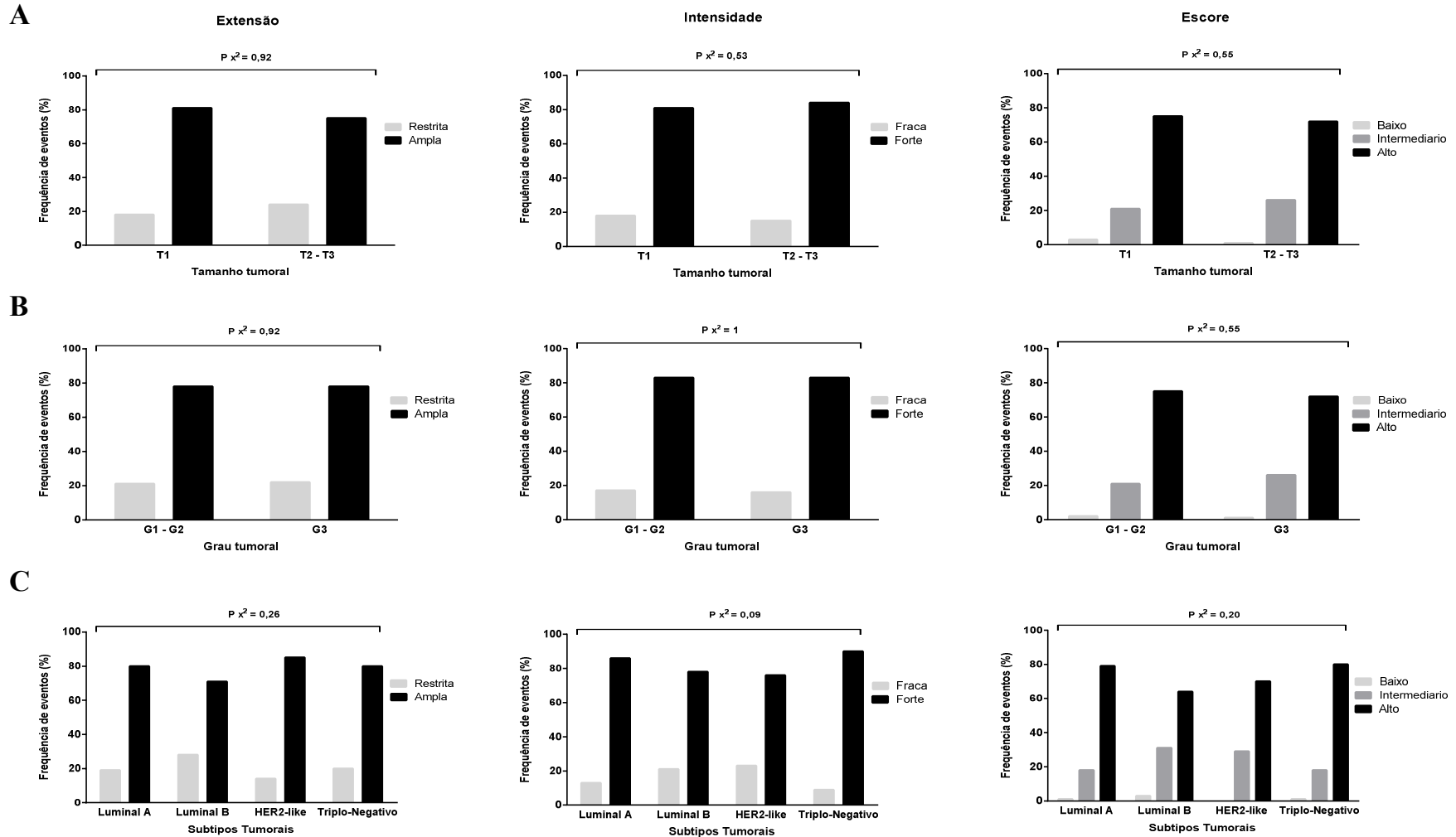


Figura 13: Histogramas de distribuição dos graus de extensão (restrito e amplo), intensidade (fraca e moderado) e escore (baixo, intermediário e alto) das reações de imunomarcção para 4-HNE entre amostras de câncer de mama invasivo (N=300), de acordo com as características morfológicas do tumor (tamanho e grau) e dos subtipos tumorais A: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função do grau (G1, G2-G3); B: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função do tamanho tumoral (T1, T2-T3); C: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função dos subtipos tumorais (luminal A, Luminal B, *Her2-like* e tripló negativo). Diferença significativa ( $P \chi^2 \leq 0,05$ ) observado pelo teste chi-quadrado ou Fisher. T1= tamanho tumoral  $\leq 2$  cm, T2-T3= tamanho tumoral  $> 2$  cm; G1-G2= baixo grau histológico, G3= alto grau histológico.

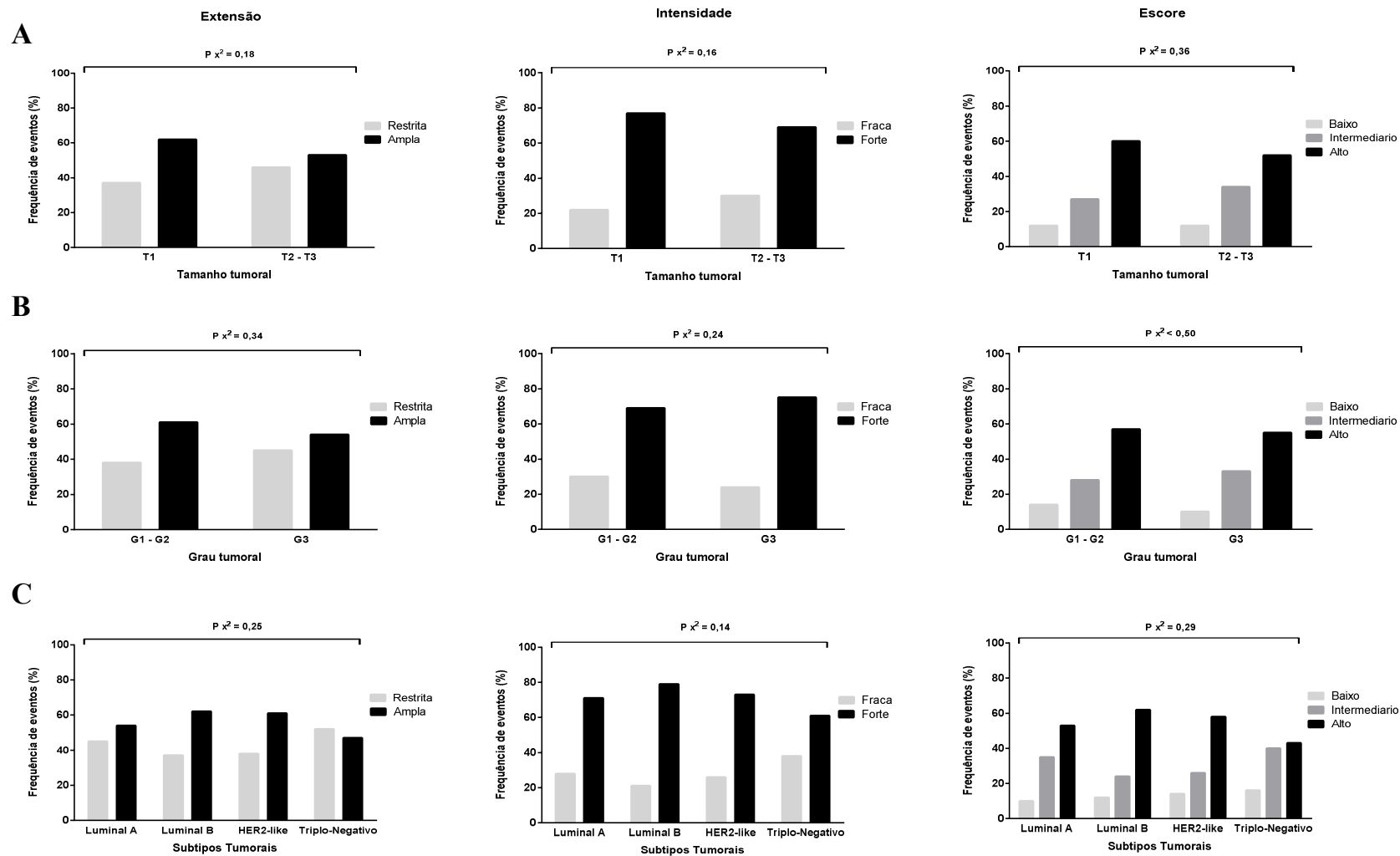


Figura 14: Histogramas de distribuição dos graus de extensão (restrito e amplo), intensidade (fraco e moderado) e escore (baixo, intermediário e alto) das reações de imunomarcacão para 3-NITRO entre amostras de câncer de mama invasivo (N=300), de acordo com as características morfológicas do tumor (tamanho e grau) e dos subtipos tumorais A: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função do grau (G1, G2-G3); B: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função do tamanho tumoral (T1, T2-T3); C: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função dos subtipos tumorais (luminal A, Luminal B, *Her2-like* e triplo negativo). Diferença significativa ( $P \chi^2 \leq 0,05$ ) observado pelo teste chi-quadrado ou Fisher. T1= tamanho tumoral  $\leq 2$  cm, T2-T3= tamanho tumoral  $> 2$  cm; G1-G2= baixo grau histológico, G3= alto grau histológico.

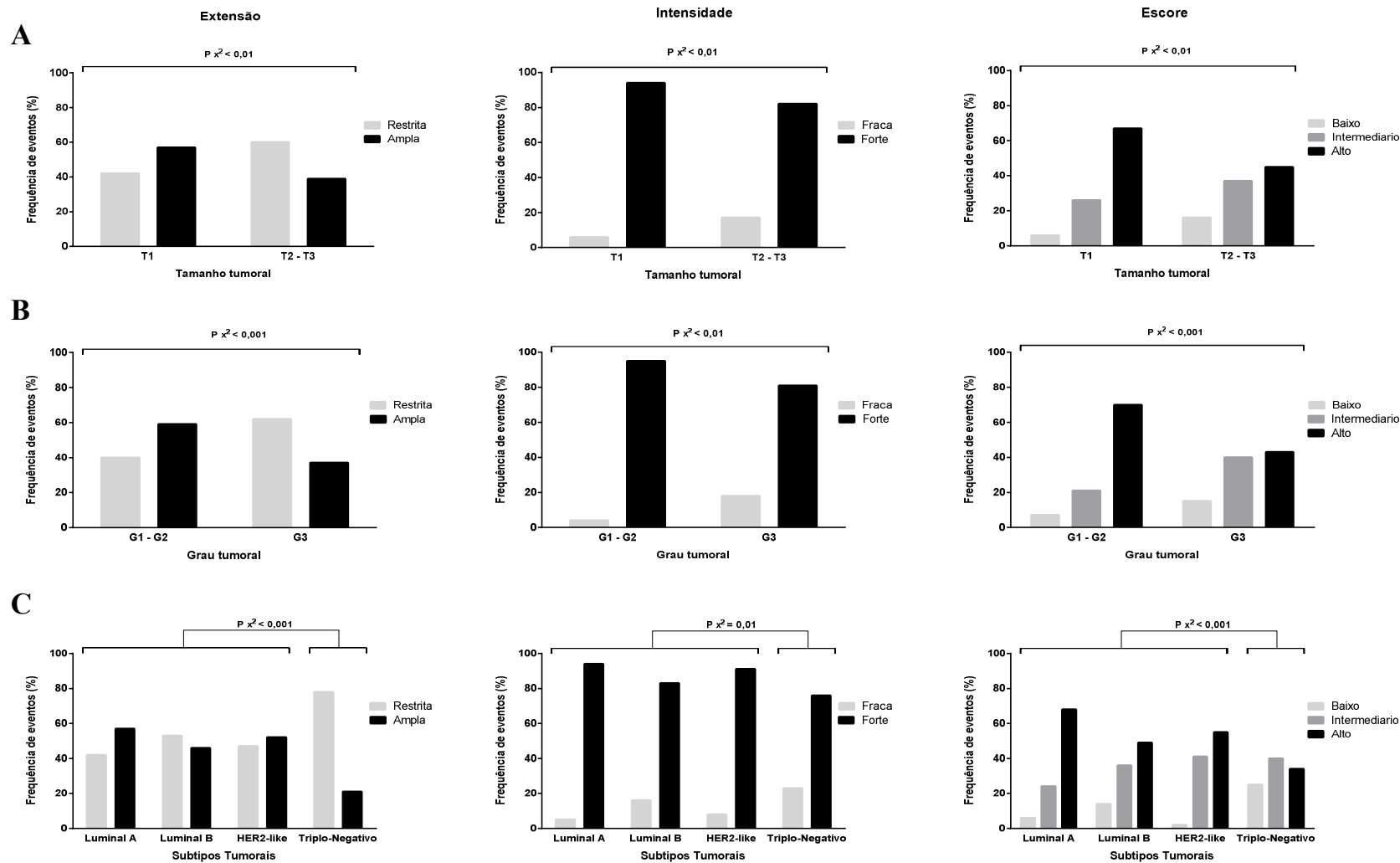


Figura 15: Histogramas de distribuição dos graus de extensão (restrito e amplo), intensidade (fraca e forte) e escore (baixo, intermediário e alto) das reações de imunomarcagem para 8-OHdG, entre amostras de câncer de mama invasivo (N=300), de acordo com as características morfológicas do tumor (tamanho e grau) e dos subtipos tumorais. A: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função do grau (G1, G2-G3); B: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função do tamanho tumoral (T1, T2-T3); C: Distribuição dos graus de extensão, intensidade e escore em função dos subtipos tumorais (luminal A, Luminal B, *Her2-like* e Tripló-Negativo). Diferença significativa ( $P \chi^2 \leq 0,05$ ) observado pelo teste chi-quadrado ou Fisher. T1= tamanho tumoral  $\leq 2$  cm; T2-T3= tamanho tumoral  $> 2$  cm; G1-G2= baixo grau histológico, G3= alto grau histológico.

**Tabela 2 : Características histopatológicas e redução de danos oxidativo ao DNA em carcinoma mamário**

Característica histopatológica	Amostra completa (N = 300)		Triplo-Negativos (N = 55)		Luminal A/B + <i>Her2-like</i> (N = 245)	
	ORajustado	IC95%	ORajustado	IC95%	ORajustado	IC95%
<b>Perda de imunomarcção de 8-OHdG (Extensão restrita)</b>						
<b>Subtipo tumoral</b>						
Luminal A/B + <i>Her2-like</i>	1		-	-	-	-
Triplo-Negativo	<b>3,0</b>	<b>1,4 - 6,0</b>	-	-	-	-
<b>Tamanho</b>						
T1	1		1		1	
T2 + T3	<b>1,7</b>	<b>1,0 - 2,8</b>	0,8	0,2 - 3,8	<b>1,9</b>	<b>1,1 - 3,3</b>
<b>Grau histológico</b>						
G1 + G2	1		1		1	
G3	<b>1,8</b>	<b>1,1 - 3,0</b>	3,1	0,6 - 16,5	1,6	0,9 - 2,8
<b>Perda de imunomarcção de 8-OHdG (Escore baixo)</b>						
<b>Característica histopatológica</b>	<b>ORajustado</b>	<b>IC95%</b>	<b>ORajustado</b>	<b>IC95%</b>	<b>ORajustado</b>	<b>IC95%</b>
<b>Subtipo tumoral</b>						
Luminal A/B + <i>Her2-like</i>	1		-	-	-	-
Triplo-Negativo	<b>2,8</b>	<b>1,3 - 6,1</b>	-	-	-	-
<b>Tamanho</b>						
T1	1		1		1	
T2 + T3	<b>2,6</b>	<b>1,1 - 6,3</b>	3,5	0,7 - 18,3	2,4	0,8 - 6,9
<b>Grau histológico</b>						
G1 + G2	1		1		1	
G3	1,5	0,6 - 3,6	2,8	0,3 - 26,3	1,4	0,5 - 3,6

## 7 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência de dano oxidativo em carcinomas mamários, comparando sua distribuição celular entre os subtipos tumorais Luminal A, Luminal B, *HER2-like* e Triplo-Negativo, definidos de acordo com a presença ou ausência dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2. Para tal, foram selecionados espécimes tumorais de carcinoma ductal invasivo, provenientes de uma coorte prospectiva de mulheres com câncer de mama primário, unilateral e não metastático, submetidas à cirurgia curativa como primeira opção terapêutica. O carcinoma ductal invasivo é o tipo histológico mais frequente entre os cânceres de mama, correspondendo a aproximadamente 80% dos casos de acordo com estudos epidemiológicos [127,128].

O carcinoma ductal invasivo não é uma entidade patológica homogênea, podendo se diferenciar quanto a aspectos morfológicos, como tamanho e grau, bem como pela expressão de receptores de estrogênio, progesterona e HER2, que levam à caracterização dos subtipos moleculares. Na amostra avaliada, em função da não inclusão de casos localmente avançados (inoperáveis) ou metastáticos, a quase totalidade dos tumores apresentava tamanho pequeno ou moderado (97% com tamanho  $\leq 5$ cm) e encontrava-se em estágios iniciais (79% com estadiamento  $\leq$  II). Contudo, houve grande predominância de graus histológicos pouco diferenciados (92% com G2 ou G3).

Para avaliar o dano oxidativo, optamos por verificar alterações em três compartimentos celulares distintos, que são afetados por diferentes processos oxidativos: os lipídeos da membrana, sujeitos à peroxidação lipídica [129], as proteínas citoplasmáticas, alvos de nitrosilação via óxido nítrico [73], e o DNA nuclear, que sofre oxidação pelo ânion superóxido [57]. Para avaliação da peroxidação lipídica, o biomarcador selecionado foi o 4-HNE, que é gerado principalmente pela peroxidação do carbono n-6 dos ácidos graxos poli-insaturados, e é considerado o mais estável de todos os aldeídos formados [65].

A oxidação proteica foi verificada pela nitrotirosina, um produto gerado pelo metabolismo do  $\cdot$ NO. A escolha desse indicador de dano proteico se deu pois a nitrotirosina é considerada um produto final estável, sendo bem visualizado pelo processo de imunohistoquímica [118]. Por fim, para verificar o dano oxidativo causado ao DNA, optamos pelo 8-OHdG, uma vez que as guaninas são as bases nitrogenadas mais sensíveis à oxidação e que também apresentam maior potencial de redução [57].

Para a realização das imunomarcações, inicialmente realizamos uma curva de diluição de cada anticorpo, de forma a obter a menor concentração capaz de produzir imunomarcações tanto nos controles positivos quanto nos casos de câncer de mama. Devido à ausência de controles negativos ideais (tecidos sem qualquer dano oxidativo), a especificidade das reações foi avaliada pelo perfil de estruturas subcelulares positivas para imunomarcações. Em todos os casos analisados, observou-se imunomarcações apenas em tecido glandular (tumoral ou normal), com identificação das regiões de citoplasma ou núcleo, dependendo do anticorpo utilizado. De acordo, as regiões de estroma mamário não apresentaram imunomarcações para nenhum dos anticorpos avaliados. Os experimentos de imunomarcações incluíram ainda uma amostra de mama normal, oriunda de uma paciente submetida à cirurgia diagnóstica em mama contralateral ao carcinoma mamário. Devido à escassez deste tipo de situação clínica, apenas uma amostra de mama normal foi obtida. Desta forma, não pudemos analisar comparativamente os níveis de expressão de cada biomarcador entre tecido tumoral e tecido mamário normal. Na amostra de mama normal avaliada, houve imunomarcações apenas para o 8-OHdG, sugerindo ausência de dano oxidativo lipídico ou proteico. Curtis *et al.*, (2010); Karihtala *et al* (2011) demonstraram ocorrência de imunomarcações para 8-OHdG em amostras de hiperplasia benigna. Os autores sugerem que a intensidade desta imunomarcações seja menor do que a observada com amostras tumorais [119][75].

A caracterização imuno-histoquímica do dano oxidativo entre os tumores de mama levou em consideração tanto a extensão quanto a intensidade das imunomarcações de cada anticorpo. Esta opção foi decorrente da observação de variabilidade destes parâmetros entre as diferentes amostras, com ocorrência de casos com baixa proporção de células tumorais intensamente marcadas e casos com alta proporção de células fracamente marcadas. Desta forma, adotamos o critério de avaliação qualitativa (intensidade) e quantitativa (extensão) proposto por Pasanen *et al.* (2012), que analisou a imunomarcações de 8-OHdG e nitrotirosina em linfomas [126]. A quantificação combinada de extensão e intensidade de imunomarcações também foi adotada por Nakamura *et al.* (2006) para avaliação de nitrotirosina em câncer de mama. Estes últimos autores também propõem um escore de avaliação global do padrão de expressão, somando os valores individuais de extensão e intensidade [121]. Outros autores, contudo, relatam métodos semi-quantitativos de avaliação da imunomarcações, sem muita clareza quanto a diferenças de extensão e intensidade entre as amostras [118][119,122].

Com relação à intensidade, foi observado em nosso estudo um predomínio de marcações moderada a forte para os três anticorpos de dano oxidativo analisado. Para o 3-Nitro, esses dados são semelhantes ao encontrado por Nakamura *et al.* (2006), que encontrou



61% de intensidade moderada a forte entre amostras de 113 espécimes de carcinoma de mama ductal invasivo. Com relação aos biomarcadores 4-HNE e 8-OHdG, Karihtala *et al.* (2011), avaliando 96 amostras de carcinoma ductal invasivo, relataram 14,8% de imunomarcção moderada a forte para o 4-HNE e 18,1% para 8-OHdG. Os autores usaram um método de avaliação semi-quantitativa e não especificaram diferenças entre extensão e intensidade da imunomarcção. Apesar disso, seus resultados sugerem diferenças marcantes em relação aos nossos, já que observamos grande proporção de amostras com intensidade de imunomarcção moderada a forte (83% para o 4-HNE e 87% para 8-OHdG) e predomínio de escores altos de expressão (73% para o 4-HNE e 54% para 8-OHdG). Com relação à imunomarcção de 8-OHdG, nossos resultados se aproximam mais dos relatados por Sova *et al.* (2010), que também observaram predomínio de marcação moderada a forte (67,5%) entre 123 amostras de carcinoma ductal.

Quando os danos oxidativos foram avaliados em função das características morfológicas do tumor (tamanho e grau) e em função dos subtipos tumorais, apenas a expressão de 8-OHdG apresentou diferenças significativas em função dessas variáveis, sendo significativamente menor entre tumores maiores do que 2 cm ou de alto grau histológico, bem como entre tumores classificados como Triplo-Negativos. A análise conjunta desses três fatores sugere que o subtipo tumoral seja o principal determinante da perda de expressão de 8-OHdG, uma vez que seu efeito se observa tanto em relação à extensão quanto em relação ao escore final de imunomarcção. Além disso, quando os tumores classificados como Triplo-Negativos são analisados separadamente, a expressão de 8-OHdG deixa de ser significativamente afetada pelas variáveis de tamanho e grau histológico. A perda de expressão de 8-OHdG em função do subtipo tumoral de carcinomas mamários também foi observada por Karihtala *et al.* (2011), que relataram uma proporção de 37,1% de amostras positivas entre tumores Triplo-Negativos, em comparação a 73,2% entre tumores ER+, PR+ e HER2- (equivalente ao Luminal A) [75]. A menor expressão de 8-OHdG em tumores do tipo Triplo-Negativo sugere que estes sejam mais resistentes a danos oxidativos sobre o DNA do que os demais subtipos tumorais.

A principal hipótese para explicar o menor dano oxidativo ao DNA observado nos tumores Triplo-Negativos quando comparado com os outros subtipos tumorais envolve o papel fisiológico do estrogênio via Receptor de Estrogênio-Alfa (RE $\alpha$ ) e a ativação de vias metabólicas independentes de estrogênio via Receptor Relacionado ao Receptor-Alfa de Estrogênio (ERR $\alpha$ ).

Estudos *in vitro* com linhagens celulares de câncer de mama sugerem que concentrações fisiológicas de estrogênio induzem estresse oxidativo, com formação de ROS principalmente nas mitocôndrias [130][131]. Células MCF-7, de câncer de mama RE+ apresentaram níveis de 8-OHdG nove vezes maiores do que os observados em células MDA-MB-231, provenientes de carcinoma mamário Triplo-Negativo [132]. De acordo, a inibição do RE $\alpha$  reduz significativamente a formação de 8-OHdG induzida por estrógeno em células MCF-7 [133].

O ERR $\alpha$  apresenta alta homologia estrutural com o RE $\alpha$ , mas diferentes perfis de expressão tecidual e diferentes funções celulares [134]. Fisiologicamente, o ERR $\alpha$  é expresso em tecidos com alta demanda metabólica, como músculos e tecido adiposo, e atua como um sensor energético, ativando diferentes funções celulares, tais como fosforilação oxidativa, oxidação  $\beta$  de ácidos graxos e biogênese, favorecendo a adaptação celular em situações de estresse [135].

Nas linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), a expressão de ERR $\alpha$  parece estar inversamente relacionada à expressão dos receptores de estrogênio e progesterona [134], sugerindo que sua expressão seja maior entre tumores classificados como Triplo-Negativos. De acordo, Suzuk *et al.*, 2004 observaram que tumores com pior prognóstico (maior risco de recorrência) apresentavam alta expressão de ERR $\alpha$  e maior captação de glicose [134,136]. A ativação de ERR $\alpha$  parece promover o metabolismo glicolítico de células tumorais, favorecendo a respiração oxidativa mitocondrial por meio de genes envolvidos nas funções oxidativas das mitocôndrias [137,138]. Além disso, este receptor pode proteger as células de câncer de mama contra dano oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio por indução de enzimas antioxidantes tais como glutathione S-transferase de MU-1 (GSTM1), glutaminase (GLS2), e superóxido dismutase 2 (SOD2) [139,140].

## **8 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

Com base em nossos resultados, podemos concluir que carcinomas mamários invasivos apresentam altos níveis de dano oxidativo decorrentes de peroxidação lipídica, nitração proteica e oxidação do DNA. Contudo, com relação ao dano ao DNA, caracterizado pela expressão de 8-OHdG, tumores Triplo-Negativos mostraram-se mais resistentes, independentemente de grau histológico e tamanho tumoral.

Como perspectiva desse trabalho, pretendemos avaliar se a imunomarcção de 8-OHdG poderá contribuir para subclassificar os tumores Triplo-Negativos, identificando espécimes de maior resistência a danos oxidativos, que possam apresentar maior risco de progressão. Para tanto, pretendemos avaliar a associação entre os níveis de expressão de 8-OHdG e desfechos clínicos, tais como sobrevida global, livre de doença e ocorrência de metástase.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO | Cancer [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 3]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* [Internet]. Jan [cited 2013 May 21];61(2):69–90.
3. Tas F, Hansel H, Belce A, Ilvan S, Argon A, Camlica H, et al. Oxidative Stress in Breast Cancer. *Med. Oncol.* 2005;22(1):11–15.
4. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol.* [Internet]. 2010 Jul 10 [cited 2013 May 24];28(20):3271–7.
5. Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res.* [Internet]. 2012 May 15 [cited 2013 May 22];72(10):2473–80.
6. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2013 Jul 10];6(1):17–32.
7. Ostman A. The tumor microenvironment controls drug sensitivity. *Nat. Med.* [Internet]. 2012 Sep [cited 2013 May 26];18(9):1332–4.
8. Dairkee SH, Nicolau M, Sayeed a, Champion S, Ji Y, Moore DH, et al. Oxidative stress pathways highlighted in tumor cell immortalization: association with breast cancer outcome. *Oncogene* [Internet]. 2007 Sep 20 [cited 2013 Jul 10];26(43):6269–79.
9. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 May 29];52(4):601–23.
10. Borek C. Dietary antioxidants and human cancer. *Integr. Cancer Ther.* [Internet]. 2004 [cited 2013 Jul 10];3:333–341.
11. Conklin K. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr. Cancer Ther.* 2004;3:294–300.
12. Cohen SM. Analysis of modifying factors in chemical carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1991 Jan ;33:21–40.
13. Silva AE da, Serakides R, Cassali GD. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. In: *Ciência Rural*. Universidade Federal de Santa Maria; 2004 [cited 2014 Feb 18]. p. 625–633.

14. Butterworth BE, Popp JA, Conolly RB, Goldsworthy TL. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *IARC Sci. Publ.* 1992 Jan;(116):279–305.
15. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-pinto H. Chemical carcinogenesis. *An. da Acad. Brasileira Ciências.* 2007;79:593–616.
16. Almeida VL de, Leitão A, Reina L del CB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova.* 2005 Feb;28(1):118–129.
17. Beltrão-Braga PCB, Texeira VR, Chammas R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. *Dieta, Nutr. e câncer.* 2004;78–87.
18. Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* 2007 Nov 1;117(11):3155–63.
19. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001 May 17;411(6835):390–5.
20. Resende RR, Ulrich H, editors. *Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research.* 2013;
21. Vineis P, Schatzkin A, Potter JD. Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis [Internet].* 2010 Oct [cited 2014 Jan 20];31(10):1703–9.
22. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med. [Internet].* 2008 Jan 31;358(5):502–11.
23. Trosko JE. Commentary: is the concept of “tumor promotion” a useful paradigm? *Mol. Carcinog.* 2001 Mar;30(3):131–7.
24. Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. Biologia molecular do câncer cervical Molecular biology of cervical cancer. *Rev. Bras. Saúde Meterno Infant.* 2006;6(4):447–451.
25. Morris MR, Ricketts C, Gentle D, Abdulrahman M, Clarke N, Brown M, et al. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2010 Apr 8;29(14):2104–17.
26. Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2008 Mar;8(3):193–204.
27. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 2008 Jan;129(7-8):391–407.
28. Clemens MR. Free radicals in chemical carcinogenesis. *Klin. Wochenschr.* 1991 Dec 15;69(21-23):1123–34.

29. Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* 1999 Jun 1;13(11):1382–97. A
30. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* . 2000 Jan;100(1):57–70.
31. Junttila MR, Sauvage FJ de. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):346–54.
32. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 2010 Jun 15;18(6):884–901.
33. Kucharzewska P, Belting M. Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J. Extracell. vesicles* [Internet]. 2013 Jan;2:1–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3760648&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 2012 Dec 1 ; 125(Pt 23):5591–6.
35. Quail DF, Joyce J a. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 2013 Nov; 19(11):1423–37.
36. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):309–22.
37. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 2004 Jul;6(1):17–32.
38. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* 2011 Mar;17(3):320–9.
39. Hu M, Polyak K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur. J. Cancer.* 2008 Dec;44(18):2760–5.
40. Cichon MA, Degenim AC, Visscher DW, Radisky DC. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2010 Dec;15(4):389–97. A
41. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):332–7.
42. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Jan;2(1):38–47.

43. Vaapil M, Helczynska K, Villadsen R, Petersen OW, Johansson E, Beckman S, et al. Hypoxic conditions induce a cancer-like phenotype in human breast epithelial cells. *PLoS One*. 2012 Jan;7(9):e46543.
44. Bustamante FLS, Souza ET, Lanznaster M, Scarpelline M. Complexos ativados por hipóxia: uma estratégia para o combate ao câncer. *Rev. Virtual Química*. 2009;1(2):138–148.
45. Semenza GL. Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Trends Mol. Med*. 2012 Sep;18(9):534–43.
46. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2007 Dec;85(12):1301–7.
47. Brown NS, Bicknell R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2001 Jan;3(5):323–7.
48. Jiang L, Greenwood TR, Artemov D, Raman V, Winnard PT, Heeren RMA, et al. Localized hypoxia results in spatially heterogeneous metabolic signatures in breast tumor models. *Neoplasia*. 2012 Aug;14(8):732–41.
49. Rieber M, Strasberg-Rieber M. Hypoxia, Mn-SOD and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulate p53 reactivation and PRIMA-1 toxicity irrespective of p53 status in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2012 Dec 15;84(12):1563–70.
50. Cosse J-P, Sermeus A, Vannuvel K, Ninane N, Raes M, Michiels C. Differential effects of hypoxia on etoposide-induced apoptosis according to the cancer cell lines. *Mol. Cancer*. 2007 Jan;6:61.
51. Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. In: *Oxidative stress*. 1985. p. 1–10.
52. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1997 Mar [;43(1):61–68.
53. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JB de F, Manfredini V, Benfato M da S, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*. 2007 Oct;30(5):1323–1338.
54. Machado S, Ribeiro R, Queiroz JH De, Gouveia C. A FORMAÇÃO E OS EFEITOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO THE FORMATION AND THE EFFECTS OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES IN. *Biosci. J*. 2005;21:133–149.
55. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000 Jun 1;108(8):652–9.
56. Finkel T, Holbrook NJ. biology of ageing. *Nature*. 2000;408(November):239–247.

57. Barreiros ALBS, David JP. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécie reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova.* 2006;29(1):113–123.
58. Rafat Husain S, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry.* 1987;26(9):2489–2491.
59. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 1989.
60. Pande D, Negi R, Karki K, Khanna S, Khanna RS, Khanna HD. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. *Transl. Res.* 2012 Dec;160(6):411–8.
61. Moylan JS, Reid MB. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve.* 2007 Apr;35(4):411–29.
62. Berra CM, Mascio P Di. ESTRESSE OXIDATIVO, LESÕES NO GENOMA E PROCESSOS DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DO CICLO CELULAR Carolina M. Berra e Carlos F. M. Menck. *Quim. Nova.* 2006;29(6):1340–1344.
63. Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1996 May;47(3):233–61. 9
64. Lima ÉS, Saes D, Abdalla P. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. 2001;37.
65. Catalá A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids.* 2009 Jan;157(1):1–11.
66. Angeli JPF, Garcia CCM, Sena F, Freitas FP, Miyamoto S, Medeiros MHG, et al. Lipid hydroperoxide-induced and hemoglobin-enhanced oxidative damage to colon cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2011 Jul 15;51(2):503–15.
67. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 2003;42:318–343.
68. Rahman I, Van Schadewijk A a M, Crowther AJL, Hiemstra PS, Stolk J, MacNee W, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002;166(19):490–495.
69. Trevisan R. Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses. 2008;1–70.
70. Dias-Junior CA, Cau SBDA, Tanus-Santos JE. Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications. *J Bras Pneumo.* 2008;34(6):412–419.



71. Dusse LMS a., Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico; Nitric oxide revision. *J. bras. patol. med. lab.* 2003;39:343–350.
72. Floriano-Sanchez E, Cerdas-Rodrigues N, Zapata-villalba M, Flores-terrazza J, Torres-Salazar J. Determinación de 3-nitrotirosina ( 3-NT ) en tejidos con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. 2009;69(5):224–230.
73. Tsikas D. Analytical methods for 3-nitrotyrosine quantification in biological samples: The unique role of tandem mass spectrometry. *Amino Acids.* 2012;42(2):45–63.
74. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol. Rev.* 1995;75:1–45.
75. Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, Jukkola-Vuorinen A. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology [Internet].* 2011 May ;58(6):854–62.
76. Ma L, Chu H, Wang M, Shi D, Zhong D, Li P, et al. hOGG1 Ser326Cys polymorphism is associated with risk of bladder cancer in a Chinese population: A case-control study. *Cancer Sci.* 2012;103(7):1215–1220.
77. Bravard A, Vacher M, Moritz E, Vaslin L, Hall J, Epe B, et al. Oxidation status of human ogg1-s326c polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.* 2009;69(8):3642–3649.
78. Costa RMA, Chiganças V, Galhardo RS, Carvalho H, Menck CFM. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.* 2003;85–1083.
79. Robbins, Contran. *Patologia: Bases Patológicas das Doenças.* 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
80. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2012 Jul;1(4):533–557.
81. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Geral.* 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
82. Macon MB, Fenton SE. Endocrine Disruptors and the Breast: Early Life Effects and Later Life Disease. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2013 Mar;18(1):43–61.
83. Ferreira C, Rocha J. *Oncologia Molecular.* Atheneu; 2004.
84. Mill CP, Chester JA, Riese DJ. EGFR may couple moderate alcohol consumption to increased breast cancer risk. *Breast Cancer (London).* 2009 Oct;2009(1):31–38.
85. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, et al. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull. World Health Organ.* 1970 Jan;43(2):209–21.

86. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA. Cancer J. Clin.* Jan;50(1):7–33.
87. Yenidunya S, Bayrak R, Haltas H. Predictive value of pathological and immunohistochemical parameters for axillary lymph node metastasis in breast carcinoma. *Diagn. Pathol.* 2011 Jan;6(1):18.
88. Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer.* 2006 Feb 15;106(4):743–50.
89. Soerjomataram I, Louwman MWJ, Ribot JG, Roukema JA, Coebergh JWW. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008 Feb;107(3):309–30.
90. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J. Clin. Oncol.* 2008 Jul 10 [cited 2014 Aug 14];26(20):3324–30.
91. Carvalho ST, Stiepcich MM, Fregnani JH, Nonogaki S, Rocha R, Soares FA. Evaluation of prognostic factors in stage IIA breast tumors and their correlation with mortality risk. *Clinics (Sao Paulo).* 2011 Jan;66(4):607–12.
92. Danova M, Delfanti S, Manzoni M, Mariucci S. Tissue and soluble biomarkers in breast cancer and their applications: ready to use? *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2011 Jan;2011(43):75–8.
93. IARC. No Globocan 2012 - Estimativa de incidência, mortalidade e prevenção mundialTitle [Internet]. 2012;Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
94. Jemal A, Bray F, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.
95. Kelsey JL, Berkowitz GS. Breast cancer epidemiology. *Cancer Res.* 1988 Oct 15;48(20):5615–23.
96. Adly S, Hewedi IH, Mokhtar NM. Clinicopathologic significance of molecular classification of breast cancer: relation to nottingham prognosis index. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* 2010 Dec;22(4):209–15.
97. Williams C, Brunskill S, Altman D, Briggs A, Campbell H, Clarke M, et al. Cost-effectiveness of using prognostic information to select women with breast cancer for adjuvant systemic therapy. *Health Technol. Assess.* 2006 Sep ;10(34):iii–iv, ix–xi, 1–204.
98. Cirqueira MB, Moreira MARM, Soares LR, Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina.* 2011;39:499–503.

99. Mayer IA, Abramson VG, Lehmann BD, Pietenpol JA. New Strategies for Triple-Negative Breast Cancer — Deciphering the Heterogeneity. 2014;20(4):782–790.
100. Polyak K. Review series introduction Heterogeneity in breast cancer. 2011;121(10):2011–2013.
101. Li CI, Daling JR, Haugen KL, Tzu M, Tang C, Porter PL, et al. Use of menopausal hormone therapy and risk of ductal and lobular breast cancer among women 55 – 74 years of age. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014;145:481–489.
102. Di Saverio S, Gutierrez J, Avisar E. A retrospective review with long term follow up of 11,400 cases of pure mucinous breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008 Oct 111(3):541–7.
103. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010 Apr;120(2):293–308.
104. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham prognostic index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1992 Oct;22(3):207–219.
105. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 2012 Oct;38(6):698–707.
106. Henry-Tillman RS, Klimberg VS. In situ breast cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* [Internet]. 2000 Aug [cited 2014 Feb 18];1(3):199–209. Available from:
107. International Union Against Cancer (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours. 6th ed. 2002.
108. Eisenberg ALA, Koifman S, Rezendo LMMC. HORMONE RECEPTORS: ASSOCIATION WITH PROGNOSTIC FACTORS FOR BREAST CANCER. *Rev. Bras. Cancerol.* 2001;47(21):49–58.
109. Lavasani MA, Moinfar F. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on “basal-like” carcinoma: a critical review. *J. Biophotonics.* 2012 Apr ;5(4):345–66.
110. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* [Internet]. 2005 Aug 15 [cited 2013 May 28];11(16):5678–85. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/11/16/5678.short>
111. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* [Internet]. 2009 May 20 [cited 2013 May 26];101(10):736–50. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/content/101/10/736.short>
112. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* [Internet]. 2004 Jan;9(6):606–16.

113. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. Cancer Res.* 2008 Mar 1;14(5):1368–76.
114. Huober J, Von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: Overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010 Nov;124(1):133–140.
115. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010 Dec;7(12):683–692.
116. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin. Cancer Res.* 2008 Mar;14(5):1368–1376.
117. Nielsen TO. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004 Aug;10(16):5367–5374.
118. Karihtala P, Winqvist R, Syväoja JE, Kinnula VL, Soini Y. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. *Eur. J. Cancer.* 2006 Oct;42(15):2653–9.
119. Curtis CD, Thorngren DL, Nardulli AM. Immunohistochemical analysis of oxidative stress and DNA repair proteins in normal mammary and breast cancer tissues. *BMC Cancer.* 2010;10:9.
120. Balestrieri ML, Dicitore A, Benevento R, Di Maio M, Santoriello A, Canonico S, et al. Interplay between membrane lipid peroxidation, transglutaminase activity, and cyclooxygenase 2 expression in the tissue adjoining to breast cancer. *J. Cell. Physiol.* 2012 Apr;227(4):1577–82.
121. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yoshidome K, Nakahara M, Nakao K, et al. Nitric oxide in breast cancer: Induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* 2006;12(4):1201–1207.
122. Sova H, Jukkola-Vuorinen a, Puistola U, Kauppila S, Karihtala P. 8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 2010;102(6):1018–1023.
123. Karihtala P, Kauppila S, Soini Y, Arja-Jukkola-Vuorinen. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. *BMC Cancer.* 2011 Jan;11(1):262.
124. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403–10.

125. Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S, Kim H, Stroup R, Garcia R, et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 1998 Feb];4(2):389–98.
126. Pasanen AK, Kuitunen H, Haapasaari K, Karihtala P, Kyll H. Expression and prognostic evaluation of oxidative stress markers in an immunohistochemical study of B-cell derived lymphomas. *Leuk. e Lymphoma.* 2012;53(July 2011):624–631.
127. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA. Cancer J. Clin.* Jan;64(1):52–62.
128. Iqbal J, Abukhatir M, Shafi AA, Alyahya GM, Alharthi BN. Hormone receptor status of breast cancer in patients of different age groups , lymph node status histological type and tumor grade , an experience at King Fahad Medical City , Riyadh Abstract : Introduction : *Park J Surg.* 2014;30:296–300.
129. Erejuwa OO, Sulaiman S a, Ab Wahab MS. Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 Jan;2013:931251.
130. Felty Q, Xiong W-C, Sun D, Sarkar S, Singh KP, Parkash J, et al. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry.* 2005 May 10;44(18):6900–9.
131. Sastre-Serra J, Valle A, Company MM, Garau I, Oliver J, Roca P. Estrogen down-regulates uncoupling proteins and increases oxidative stress in breast cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 2010 Feb 15;48(4):506–512.
132. Musarrat J, Arezina-Wilson J, Wani AA. Prognostic and aetiological relevance of 8-hydroxyguanosine in human breast carcinogenesis. *Eur. J. Cancer.* 1996 Jun;32A(7):1209–14.
133. Yao Y, Brodie AMH, Davidson NE, Kensler TW, Zhou Q. Inhibition of estrogen signaling activates the NRF2 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010 Nov;124(2):585–91. 134. Ariazi E a, Kraus RJ, Farrell ML, Jordan VC, Mertz JE. Estrogen-related receptor alpha1 transcriptional activities are regulated in part via the ErbB2/HER2 signaling pathway. *Mol. Cancer Res.* 2007;5(January):71–85.
135. May FEB. Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: Their therapeutic potential in breast cancer. *Cancer Manag. Res.* 2014;6:225–252.
136. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, et al. Estrogen-related receptor alpha in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res.* 2004;64:4670–4676.
137. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92:829–839.

138. Huss JM, Gigue V, Kelly DP. Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  Directs Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Signaling in the Transcriptional Control of Energy Metabolism in Cardiac and Skeletal Muscle. *Society*. 2004;24(20):9079–9091.
139. Stein R a., Chang CY, Kazmin D a., Way J, Schroeder T, Wergin M, et al. Estrogen-related receptor  $\alpha$  is critical for the growth of estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(21):8805–8812.
140. Deblois G, Chahrour G, Perry M-C, Sylvain-Drolet G, Muller WJ, Giguère V. Transcriptional control of the ERBB2 amplicon by ERRalpha and PGC-1beta promotes mammary gland tumorigenesis. *Cancer Res*. 2010;70:10277–10287.

## ANEXO I

---

### Classificação clínica e histopatológica do câncer de mama pelo sistema TNM

---

#### **T - tamanho do tumor**

- Tx - O tumor primário não pode ser avaliado
- T0 - Sem evidência de tumor primário
- Tis - Carcinoma *in situ*: carcinoma intraductal ou carcinoma lobular *in situ* ou doença de Paget
- T1 - Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
  - T1a - tumor com 0,5 cm ou menos em sua maior dimensão
  - T1b - tumor com mais de 0,5 cm e até 1 cm em sua maior dimensão
  - T1c - tumor com mais de 1 cm e até 2 cm em sua maior dimensão
- T2 - Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão
- T3 - Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
- T4 - Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta à parede torácica ou à pele
  - T4a - extensão para parede torácica
  - T4b - edema (incluindo peau d'orange) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites, confinados à mesma mama
  - T4c - T4a e T4b associados
  - T4d - carcinoma inflamatório

#### **N - linfonodos regionais**

- Nx - Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
- cN0 - Ausência de metástases nos linfonodos regionais
- cN1 - Crescimento tumoral ipsilateral, sem acometimento dos linfonodos axilares
- cN2 - Crescimento tumoral ipsilateral, acometendo linfonodos axilares ou internos
- cN3 - Acometimento linfonodos supraclavicular ou ambos axilares ipsilateral e internos
- pN0 - Sem acometimento dos linfonodos
- pN1 - Acometimento de 1 a 3 linfonodos
- pN1mi - Tumor no linfonodo com tamanho  $\leq 2,0$
- pN2 - Acometimento de 4 a 9 linfonodos
- pN3 - Acometimento  $\geq 10$  linfonodos

#### **M - metástases a distância**

- Mx - A presença de metástases a distância não pode ser avaliada
- M0 - Ausência de metástases a distância
- M1 - Metástases a distância (incluindo as metástases nos linfonodos supraclaviculares)

---

A categoria N possui duas classificações. A primeira é a clínica, representado pela letra c e a segunda é a classificação patológica, representado pela letra p

Fonte: Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama, Sociedade Brasileira de Mastologia,

## ANEXO II

Estadiamento do câncer de mama			
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: NCCN Guidelines for Pacientes. V.2.2011



### ANEXO III



Memo 33/09-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 12 de fevereiro de 2009.

A(o): Dr(a) Rosanne Vianna Jorge  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP nº 129/08** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
**Título do Estudo:** Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer de mama

Prezada Pesquisadora,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou após re-análise, o estudo intitulado: **Polimorfismo genético e evolução clínica, resposta terapêutica e reações adversas em pacientes submetidas ao tratamento do câncer mama**, bem como seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 2)**, em 2 de fevereiro de 2009.

**Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo. As datas previstas são: Agosto/2009 e Fevereiro/2010.**

A documentação pertinente será encaminhada a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'AScheliga'.

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

C/c – Dr. Guilherme Kurtz – Chefe da Divisão de Farmacologia/CPQ  
Dra. Marisa Breitenbach – Coordenadora Pesquisa/CPQ  
Dr. César Augusto Lasmar – Diretor do HCIII

## ANEXO IV

Saúde  
Ministério da Saúde

 Plataforma Brasil

[Público](#) [Pesquisador](#) [Alterar Meus Dados](#)

[Início](#) [Centro de suporte](#) [Sair](#)

Hayza de Andrade Vieira Mosteiro - Pesquisador | V2.21

Projeto de Pesquisa:							
Tipo	Número CAAE	Título da Pesquisa	Pesquisador Responsável	Versão	Última Modificação	Situação	Gestão da Pesquisa
P	31108414.6.0000.5240	Caracterização do perfil oxidativo de tumores de mama: avaliação de associação com subtipo(...)	Thales Nascimento e Castro	3	27/11/2014	Aprovado	