



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

FLAVIO FONTES PIROZZI

Investigação dos mecanismos moleculares  
associados à adesão celular, inflamação e  
crescimento tumoral através da expressão  
proteica e gênica – a complexa relação do  
câncer de mama e a obesidade

São José do Rio Preto

2023

Flavio Fontes Pirozzi

Investigação dos mecanismos moleculares  
associados à adesão celular, inflamação e  
crescimento tumoral através da expressão  
proteica e gênica – a complexa relação do  
câncer de mama e a obesidade

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São  
José do Rio Preto (FAMERP) para obtenção do  
Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde.

Eixo temático: Medicina Interna

Orientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de  
Campos Zuccari

São José do Rio Preto

2023

Pirozzi, Flavio Fontes

Investigação dos mecanismos moleculares associados à adesão celular, inflamação e crescimento tumoral através da expressão proteica e gênica – a complexa relação do câncer de mama e a obesidade

Flavio Fontes Pirozzi.

São José do Rio Preto, 2023

160 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Área de concentração: Medicina Interna

Orientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. Câncer de mama; 2. Obesidade; 3. Vias moleculares; 4. Inflamação.

Flavio Fontes Pirozzi

Investigação dos mecanismos moleculares associados à adesão celular,  
inflamação e crescimento tumoral através da expressão proteica e gênica – a  
complexa relação do câncer de mama e a obesidade

BANCA EXAMINADORA

Presidente e orientador: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de C. Zuccari

2º Examinador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pires

3º Examinador: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

4º Examinador: Prof. Dr. Roberto Luiz Kaiser Júnior

5º Examinador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi da Silva Souza

Suplentes:

Prof. Dr. Luiz Gustavo de Quadros

Profa. Dra. Adriana Alonso Novais

São José do Rio Preto, 01/08/2023

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), da Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP) de São José do Rio Preto, com recursos próprios.**

## Dedicatória

*Dedico este trabalho à minha esposa, minha filha, aos meus pais e todos os mestres que passaram pela minha trajetória por todo amor, carinho, apoio e incentivo incondicional durante essa longa e árdua trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, **João Octávio de Biasi Pirozzi** e **Izabel Cristina**

**Ferreira Fontes Pirozzi**, por todo amor, carinho e por sempre acreditar em mim; vocês são meus maiores exemplos de dedicação a família, estudos e ao trabalho.

À minha amada esposa, **Maria Laura Muniz Pirozzi**, você me ensinou que é possível amar e ser feliz de novo nessa vida; me desculpa pelos momentos de ausência e obrigado por toda a sua paciência, carinho, cumplicidade e amor que eu recebo por ter você sempre do meu lado.

À minha querida filha, **Nicole Alves Pirozzi**, minha razão de viver e meu presente mais precioso; mais do que ensinar, com você aprendo todos os dias sobre o amor incondicional de ser pai.

À minha irmã, **Renata Fontes Bizarri**, e meu cunhado, **João Henrique Bizarri** e as minhas queridas sobrinhas, **Bianca Bizarri** e **Elisa Bizarri** por todo amor, carinho, respeito e admiração.

Para toda a família **Ferreira Fontes** e a família **Pirozzi**, muito obrigado pelo carinho, respeito e amor ao longo de todos estes anos

Ao meu sogro, **Júlio**, e minha sogra, **Darcilene** e toda a família **Muniz**; minha nova família que desde o início me acolheu com todo amor e carinho; obrigado por todo respeito e admiração que eu recebo de todos vocês.

Aos meus professores da graduação, especialmente, aos meus mentores da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Catanduva,

**Dr. Marcos Antônio Lopes e Dr. Marino Cattalini**, por sempre confiarem no meu trabalho e serem fontes inspiradoras de ética e trabalho na minha carreira e que tanto me deram força para seguir na carreira acadêmica. Aos meus professores da residência de Endocrinologia na Faculdade de Medicina de Rio Preto, **Dr. Antônio Carlos Pires, Dr. Marco Antônio Dias, Dra. Lucia Helena Tácito, Dra. Luciana Vilela, Dra. Maristela Rui e Dr. Daniel Laguna** pelos mais de dois anos de convívio intenso e muito aprendizado, respeito, ciência e ética.

Aos meus colegas do Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), em especial **Jucimara Colombo** e também aos colegas Bianca, Guilherme Tamarindo, Douglas, Isabela, Bárbara, Caroline, Victoria, Beatriz, Guilherme Barbosa, Vitor, Felipe, Bruno, Adriana e todos àqueles que de uma forma, direta e indireta, contribuíram para este trabalho, o auxílio com a análise laboratoriais e os dados estatísticos deste estudo, e claro, pelos momentos de profunda discussão científica e também descontração.

Aos funcionários da Secretaria da Pós Graduação da FAMERP, em especial ao amigo **Luis Henrique Ferreira**, por toda competência, profissionalismo, paciência e apoio nessa jornada.

Aos meus queridos amigos **Profa. Dra. Lilian Castiglioni e Prof. Dr. Gustavo Chuffa** pela grandiosa ajuda e colaboração com essa pesquisa.

Aos meus amigos e colegas da disciplina de Endocrinologia e Metabologia e de disciplina de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UNILAGO, especialmente, meus colegas e companheiros dessa

*jornada **Dr. Cléber Rinaldo Fávaro** e **Prof. Dra. Tatiana Assad***

***Domingos Theodoropoulos.***

*Aos colegas e coordenadores da instituição que há quase uma década vem confiando no meu trabalho, **Dr. Edmo Atique Gabriel** e **Dra. Soraia El Hassam**, e todos os amigos e docentes da Faculdade de Medicina da UNILAGO de São José do Rio Preto.*

*Aos meus **alunos** da Faculdade de Medicina da UNILAGO; vocês são grande parte da inspiração e força que busco para me aprimorar a cada dia como docente dessa instituição.*

*Aos meus queridos orientadores do meu mestrado, **Prof. Dr. Milton Ruiz** e **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, muito obrigado por todo incentivo e a base para que eu desse continuidade a este processo.*

*À minha querida orientadora, **Prof. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari**, por todo carinho e confiança que em mim foram depositados para que tivesse mais este êxito em minha vida acadêmica e tanto contribuir para o meu crescimento científico e pessoal; sou eternamente grato.*

*A **Deus** pelo dom da vida e da sabedoria.*

***"Existem muitas hipóteses em Ciência que estão erradas.  
Isso é perfeitamente aceitável; elas são a abertura  
para achar as que estão certas"  
(Carl Sagan)***

## RESUMO

**Introdução:** A obesidade é um importante fator de risco para o surgimento do câncer de mama (CM). Pacientes com esta neoplasia e obesidade apresentam pior fator prognóstico com maiores taxas de metástase, aumento de resistência aos tratamentos convencionais e menores taxas de sobrevida. A melhor compreensão entre o papel da obesidade, alterações genéticas e suas vias moleculares é de extrema importância para a prevenção e um tratamento mais individualizado do CM em mulheres que apresentam excesso de peso. A E-caderina, sintetizada a partir do gene *CDH1* (gene da proteína caderina-1 ativadora de APC/C) e a Vimentina (VIM) são proteínas envolvidas na adesão celular e têm importância na progressão e no risco de metástase do CM. Tanto VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) com AKT (proteína quinase B) desempenham papéis importantes na progressão e na resposta ao tratamento enquanto interleucinas (IL), especialmente IL-17B e IL-8, estão associadas a processos inflamatórios e câncer. **Objetivos:** Avaliar o papel das alterações gênicas e das vias moleculares inflamatórias da obesidade no CM por expressão gênica (RT-PCR) e expressão proteica (IHQ). **Casística e Métodos:** Selecionamos as pacientes acordo com o índice de massa corpórea (IMC) - com obesidade as de  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$  e sem obesidade as de  $IMC < 30 \text{ kg/m}^2$  - e o resultado da patologia (carcinoma ductal invasivo ou benigno) e as pacientes foram divididas em quatro grupos: grupo 1 (CM com obesidade), grupo 2 (controle com obesidade), grupo 3 (CM sem obesidade) e grupo 4 (controle sem obesidade) para análise da expressão gênica do *CDH1*, *VIM*, *IL17B* e *IL8*. Entre as pacientes com CM, selecionamos pacientes com obesidade (grupo 1a) e sem obesidade (grupo 3a) para análise da expressão proteica da E-caderina, Vimentina, VEGF e AKT. **Resultados:** Na avaliação dos resultados da RT-PCR, na comparação entre os grupos 1 e 3, não encontramos diferença significativa na expressão dos genes *CDH1* (IC 95% de -2,228 a 0,8815,  $p = 0,3771$ ), *VIM* (IC 95% de -1,460 a 0,906,  $p = 0,6266$ ), *IL17B* (IC95% de -2,640 a 5,329,  $p = 0,5005$ ) e *IL8* (IC 95% de -2,625 a 2,086,  $p = 0,8195$ ). Na avaliação dos resultados da IHQ, na comparação entre os

grupos 1a e 3a, encontramos menor expressão proteica da E-caderina (IC 95% de 13,08 a 30,51,  $p < 0,0001$ ) e maior expressão proteica da Vimentina (IC 95% de -45,46 a -28,40,  $p < 0,0001$ ), VEGF (IC 95% de -45,00 a -27,00,  $p < 0,0001$ ) e AKT (IC 95% de -37,72 a -18,89,  $p < 0,001$ ) nas pacientes com obesidade. **Conclusões:** A menor expressão da E-caderina e a maior expressão da Vimentina, VEGF e AKT em pacientes com CM e obesidade indicam que a obesidade não apenas aumenta risco de desenvolver CM, mas também piora o prognóstico da doença, aumenta o risco de proliferação e invasão tumoral. Embora não tenhamos encontrado diferença significativa na expressão gênica entre os grupos, observamos variações individuais que destacam a heterogeneidade da obesidade.

**Palavras chaves:** Obesidade, Câncer de Mama, Síndrome Metabólica, Inflamação, Angiogênese.

## ABSTRACT

**Introduction:** Obesity is an important risk factor for breast cancer (BC). Patients with this neoplasm and obesity have a worse prognostic factor with higher rates of metastasis, increased resistance to conventional treatments and lower survival rates. A better understanding of the role of obesity, genetic alterations and its molecular pathways is extremely important for the prevention and more individualized treatment of BC in overweight women. E-cadherin, synthesized from the *CDH1* gene (gene APC/C activator protein cadherin-1) and Vimentin are proteins involved in cell adhesion and are important in the progression and risk of metastasis of BC. Both VEGF (vascular endothelial growth factor) and AKT (protein kinase B) play important roles in progression and response to treatment while interleukins (IL), especially IL-17B and IL-8, are associated with inflammatory processes and cancer. **Objectives:** To evaluate the role of genetic alterations and inflammatory molecular pathways of obesity in BC by gene expression (RT-PCR) and protein expression (IHC). **Casuistry and Methods:** We selected patients according to body mass index (BMI) - with obesity those with BMI  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup> and without obesity those with BMI  $< 30$  kg/m<sup>2</sup> - and the result of the pathology (invasive ductal carcinoma or benign) and the patients were divided into four groups: group 1 (CM with obesity), group 2 (control with obesity), group 3 (CM without obesity) and group 4 (control without obesity) for analysis of gene expression of *CDH1*, *VIM*, *IL17B* and *IL8*. Among patients with BC, we selected patients with obesity (group 1a) and without obesity (group 3a) for analysis of E-cadherin, Vimentin, VEGF and AKT protein expression. **Results:** In the evaluation of the RT-PCR results, in the comparison between groups 1 and 3, we found no significant difference in the expression of genes *CDH1* (95% CI -2.228 to 0.8815,  $p = 0.3771$ ), *VIM* (95% CI -1.460 to 0.906,  $p = 0.6266$ ), *IL17B* (95% CI -2.640 to 5.329,  $p = 0.5005$ ) and *IL8* (95% CI -2.625 to 2.086,  $p = 0.8195$ ). In the evaluation of the IHC results, in the comparison between groups 1a and 3a, we found lower protein expression

of E-cadherin (95% CI from 13.08 to 30.51,  $p < 0.0001$ ) and higher protein expression of Vimentin (95% CI -45.46 to -28.40,  $p < 0.0001$ ), VEGF (95% CI -45.00 to -27.00,  $p < 0.0001$ ) and AKT (95% CI -37.72 to -18.89,  $p < 0.001$ ) in patients with obesity. **Conclusions:** The lower expression of E-cadherin and the higher expression of Vimentin, VEGF and AKT in patients with BC and obesity indicate that obesity not only increases the risk of developing BC, but also worsens the prognosis of the disease, increases the risk of proliferation and tumor invasion. Although we found no significant difference in gene expression between groups, we observed individual variations that highlight the heterogeneity of obesity.

**Keywords:** Obesity, Breast Cancer, Metabolic Syndrome, Inflammation, Angiogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

| Figuras                                                                                                                       | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1: Epidemiologia global da obesidade                                                                                   | 7      |
| Figura 2: Ranking dos países com números relativos de pacientes com obesidade entre 1973 a 2014                               | 9      |
| Figura 3: Vias moleculares e inflamatórias da carcinogênese na obesidade                                                      | 18     |
| Figura 4: Fluxograma da análise de genes candidatos pelo NGS                                                                  | 34     |
| Figura 5: Fluxograma da análise da expressão gênica e proteica para avaliar a correlação entre o câncer de mama e a obesidade | 38     |
| Figura 6: Expressão gênica do <i>CDH1</i> nas pacientes com obesidade                                                         | 49     |
| Figura 7: Expressão gênica do <i>CDH1</i> nas pacientes sem obesidade                                                         | 49     |
| Figura 8: Expressão gênica da <i>VIM</i> nas pacientes com obesidade                                                          | 51     |
| Figura 9: Expressão gênica da <i>VIM</i> nas pacientes sem obesidade                                                          | 51     |
| Figura 10: Expressão gênica da <i>IL17B</i> nas pacientes com obesidade                                                       | 53     |
| Figura 11: Expressão gênica da <i>IL17B</i> nas pacientes sem obesidade                                                       | 53     |
| Figura 12: Expressão gênica da <i>IL8</i> nas pacientes com obesidade                                                         | 55     |
| Figura 13: Expressão gênica da <i>IL8</i> nas pacientes sem obesidade                                                         | 55     |
| Figura 14: Avaliação quantitativa da expressão proteica da E-caderina                                                         | 58     |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15: Expressão imuno-histoquímica da E-caderina                | 58 |
| Figura 16: Avaliação quantitativa da expressão proteica da Vimentina | 59 |
| Figura 17: Expressão imuno-histoquímica da Vimentina                 | 60 |
| Figura 18: Avaliação quantitativa da expressão proteica do VEGF      | 61 |
| Figura 19: Expressão imuno-histoquímica do VEGF                      | 61 |
| Figura 20: Avaliação quantitativa da expressão proteica da AKT       | 62 |
| Figura 21: Expressão imuno-histoquímica da AKT                       | 63 |

## LISTA DE QUADROS

| Quadros                                                                                             | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Quadro 1: Fórmula e classificação da obesidade conforme o índice de massa corpórea                  | 5      |
| Quadro 2: Características clínicas basais entre os grupos analisados para a expressão gênica        | 46     |
| Quadro 3: Características clínicas basais entre os dois grupos analisados para a expressão proteica | 56     |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT: do inglês: *protein kinase B*

AMPK: proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina

AVC: acidente vascular cerebral

BRA: bloqueador do receptor da angiotensina

BRCA: do inglês: *breast cancer gene*

CDH1: do inglês: *APC/C activator protein cadherin-1*

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEP: comitê de ética e pesquisa

CM: câncer de mama

DAB: melan-A e diâmino benzidina

DCV: doença cardiovascular

DLP: dislipidemia

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

E-cad: *epithelial cadherin*

ER: receptor de estrogênio

FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FEBRASGO: federação brasileira das associações de ginecologia e obstetrícia

FTO: do inglês: *fat mass and obesity-associated protein*

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HER2: do inglês: *human epidermal growth factor receptor type-2*

HIF-1: fator 1-alfa induzido por hipóxia

IAM: infarto agudo do miocárdio

iECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina

IGF-I: do inglês: *insulin-like growth factor-1*

IHQ: imuno histoquímica

IL: interleucina

Kg/m<sup>2</sup>: referente a relação entre o peso em quilos pela altura em metros elevado quadrado

IMC: índice de massa corpórea

INCA: instituto nacional do câncer

MS: ministério da saúde

MTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

NF-κB: fator nuclear kappa-B

NGS: do inglês: *next generation sequencing*

PBS: *salina tamponade com fosfato*

PGE2: prostaglandina E2

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

PPARγ: receptor ativador de proliferação peroxissomal-γ

RNA: ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensageiro

RE: receptor de estrógeno

RH: receptor hormonal

RP: receptor de progesterona

Rpm: rotação por minuto

RT-PCR: do inglês: *real time polymerase chain reaction*

TLR: do inglês: *toll-like receptors*

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

USA: do inglês: *United State of America*

VEGF: do inglês: *vascular epithelial (or endotelial) growth fator*

VIM: vimentina

ZEB: do inglês: *zinc-finger E-box-binding*

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                    |              |
|--------------------|--------------|
| $\alpha$           | alfa         |
| $\beta$            | beta         |
| $\gamma$           | gama         |
| $\Delta$           | delta        |
| $^{\circ}\text{C}$ | grau Celsius |
| V                  | voltz        |
| ml                 | mililitro    |
| $\mu\text{L}$      | microlitro   |

## SUMÁRIO

| Capítulos e seções                                               | Página |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Introdução                                                    | 1      |
| 1.1. Aspectos gerais                                             | 2      |
| 1.2. Etiologia da obesidade                                      | 3      |
| 1.3. Classificação da obesidade                                  | 4      |
| 1.4. Epidemiologia da obesidade                                  | 6      |
| 1.5. Características gerais do câncer de mama                    | 10     |
| 1.6. Carcinogênese e obesidade                                   | 14     |
| 1.7. Genética, vias moleculares da obesidade e câncer de<br>mama | 19     |
| 1.8. Adesão celular, obesidade e câncer de mama                  | 22     |
| 1.9. Inflamação, obesidade e câncer de mama                      | 24     |
| 1.10. Crescimento tumoral, obesidade e câncer de mama            | 27     |
| 2. Objetivos                                                     | 30     |
| 2.1. Objetivo geral                                              | 31     |
| 2.2. Objetivos específicos                                       | 31     |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. Casuística e Métodos                                                  | 32 |
| 3.1. Considerações éticas                                                | 33 |
| 3.2. Seleção dos genes candidatos                                        | 33 |
| 3.3. Seleção das pacientes e formação dos grupos                         | 36 |
| 3.4. Extração do RNA                                                     | 39 |
| 3.5. Expressão gênica por RT-PCR quantitativo em tempo<br>real (qRT-PCR) | 40 |
| 3.6. Análise da expressão das proteínas                                  | 41 |
| 3.7. Análises estatísticas                                               | 43 |
| 4. Resultados                                                            | 45 |
| 4.1. Resultados da expressão gênica                                      | 46 |
| 4.2. Resultados da expressão imuno-histoquímica das<br>proteínas         | 56 |
| 5. Discussão                                                             | 64 |
| 5.1. Discussão geral                                                     | 65 |
| 6. Conclusões                                                            | 90 |
| 6.1. Conclusões                                                          | 91 |

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| Referências Bibliográficas | 93  |
| Apêndice I                 | 121 |
| Apêndice II                | 138 |
| Anexo I                    | 155 |
| Anexo II                   | 158 |

## **1. Introdução**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Aspectos Gerais**

A obesidade é uma condição em que há acúmulo excessivo de tecido gorduroso corporal, resultando em um peso acima do considerado saudável. Considerada uma doença crônica e progressiva de fisiopatologia complexa que envolve uma interação entre fatores genéticos, ambientais, comportamentais e metabólicos.<sup>(1,2)</sup>

A obesidade é um dos principais problemas e desafios de saúde pública no século XXI. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos mostram que houve importante aumento da prevalência do excesso de peso em todas as partes do mundo. Por meio de métodos para avaliar o excesso de peso da população, é marcante o aumento do número de indivíduos com sobrepeso e obesidade e redução entre as pessoas com peso normal e baixo peso.<sup>(2)</sup>

Consequentemente, o aumento da prevalência mundial da obesidade está diretamente relacionado ao aumento de outros problemas crônicos de saúde. O aumento do peso corporal está associado a doenças como hipertensão (HAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dislipidemia (DLP) -sendo essas as principais componentes da síndrome metabólica – doenças osteoarticulares, apneia obstrutiva do sono, esteatose hepática e o aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC).<sup>(3)</sup>

Porém, existem doenças que por vezes são pouco correlacionadas ao aumento do peso, como o câncer. Estudos científicos apontam a obesidade como parte fundamental da fisiopatologia de alguns tipos de neoplasias. Atualmente, o excesso de tecido gorduroso aparece como um fator de risco independente para 13 tipos de carcinomas, entre eles, o câncer de mama (CM).<sup>(4-6)</sup>

Apesar de raros casos de obesidade causada por alterações monogênicas, a maioria dos casos de obesidade são multifatoriais na sua fisiopatologia. Do ponto de vista genético, sabe-se da existência de centenas de variantes associadas ao ganho de peso. Além disso, maus hábitos alimentares, sedentarismo, inversão do ciclo sono-vigília, entre outros fatores também estão associados com o aumento do peso e, muitas dessas alterações genéticas e ambientais ocorrem em associação com o desenvolvimento do CM em mulheres com obesidade.<sup>(7)</sup>

## **1.2 Etiologia da Obesidade**

A obesidade é uma doença crônica, um processo inflamatório subagudo de etiologia multifatorial, na qual estão envolvidos fatores genéticos e ambientais.<sup>(8)</sup> Na questão genética, apesar de existirem formas monogênicas de obesidade e síndromes genéticas relacionadas com essa doença; a principal influência genética envolvida com o aumento de peso é poligênica

conferindo maior susceptibilidade de acordo com a dieta, os hábitos alimentares e maior risco de desenvolver distúrbios metabólicos.<sup>(1)</sup>

Estudos apontam mais de 300 genes envolvidos na gênese da obesidade em humanos. Dentre as alterações genéticas relacionadas com a obesidade poligênica destaca-se o polimorfismo do gene *FTO* (*fat mass and obesity-associated protein gene*), responsável pelo acúmulo de gordura visceral e resistência a ação da insulina.<sup>(9,10)</sup>

Por ser uma doença multifatorial, existe forte envolvimento dos fatores genéticos com o meio ambiente. Dentre os aspectos ambientais mais importantes, destacam-se os maus hábitos alimentares e o sedentarismo que levam ao acúmulo de tecido adiposo, especialmente, na região abdominal (a gordura visceral), o que determina maior risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas.<sup>(11)</sup>

### **1.3 Classificação da Obesidade**

Devido às diferentes formas de distribuição do tecido adiposo, podemos classificar a obesidade por meio de medidas como a circunferência abdominal, relação das circunferências da cintura e do quadril, bioimpedância elétrica, quantificação do tecido adiposo por meio de exames de imagem ou pelo cálculo do índice de massa corpórea (IMC).<sup>(12)</sup>

O valor do IMC é calculado pela divisão do peso (em quilogramas) pela altura (em metros) elevado ao quadrado – ou seja,  $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m)}^2$

x altura (m) - e o paciente pode ser classificado como: baixo peso (IMC < 18,5 kg/m<sup>2</sup>), peso normal (IMC entre 18,5 e 24,9 kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m<sup>2</sup>) e obesidade (IMC ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>) (Quadro 1). A obesidade pode ser dividida em três graus: obesidade grau I (IMC entre 30,0 e 34,9 Kg/m<sup>2</sup>), obesidade grau II (IMC entre 35,0 e 39,9 kg/m<sup>2</sup>) e obesidade grau III (IMC ≥ 40,0 kg/m<sup>2</sup>).<sup>(12,13)</sup>

Quadro 1. Fórmula e classificação da obesidade conforme o Índice de Massa Corpórea (IMC)

| $\text{IMC} = \frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Altura (m)}^2}$ |                               |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Classificação</b>                                        | <b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b> |
| Baixo peso                                                  | Menor ou igual a 18,4         |
| Peso normal                                                 | 18,5 até 24,9                 |
| Sobrepeso                                                   | 25,0 até 29,9                 |
| Obesidade grau I                                            | 30,0 até 34,9                 |
| Obesidade grau II                                           | 35,0 até 39,9                 |
| Obesidade grau III                                          | Maior ou igual a 40,0         |

Legenda do quadro: IMC (índice de massa corpórea). Fonte: Vécchie et al<sup>(12)</sup>

Há questionamentos sobre a aplicação do IMC em relação à gravidade da obesidade, entretanto, este cálculo é uma das formas mais utilizadas para a classificação da obesidade pela sua facilidade, pois depende de apenas duas variáveis do paciente (peso e altura). É utilizada como parâmetro de obesidade em grande parte dos artigos científicos por apresentar grande e importante correlação do risco de doenças associadas a obesidade, assim como o CM. <sup>(12-14)</sup>

#### **1.4 Epidemiologia da Obesidade**

A obesidade, ou seja, aqueles indivíduos com  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , está presente em mais de 600 milhões de adultos por todo o mundo e é um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade.<sup>(15)</sup> Estudo recente, com dados do ano de 2014, mostra que existiam mais de 600 milhões de pessoas com  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ . A maioria do sexo feminino, sendo que, no ano de 1975 existia pouco mais de 100 milhões de indivíduos com o mesmo problema. Atualmente, sabe-se que o sobrepeso e a obesidade atingem mais de 100 milhões de pessoas apenas nos Estados Unidos, ou seja, cerca de 68% da população adulta deste país e, destes, cerca de 30% apresentam IMC de obesidade. Nas últimas décadas, quando avaliado o número de pessoas com obesidade nos Estados Unidos, houve importante aumento na prevalência de indivíduos que passaram a apresentar IMC compatível com obesidade grau III.<sup>(15)</sup>

Analisando dados epidemiológica das últimas quatro décadas, houve redução do número de indivíduos com baixo peso e peso normal e um incremento significativo daqueles que apresentam sobrepeso e obesidade, em todas as partes do mundo (Figura 1). Entre as pessoas com obesidade, quase 30% foram classificados como obesidade grave, ou seja, com obesidade grau II e grau III. Apenas 18,4% desses indivíduos com obesidade vivem em países desenvolvidos, o que implica em menor uso de recursos financeiros para o tratamento direto e indireto para a maioria dos pacientes com obesidade e as suas complicações.<sup>(2)</sup>

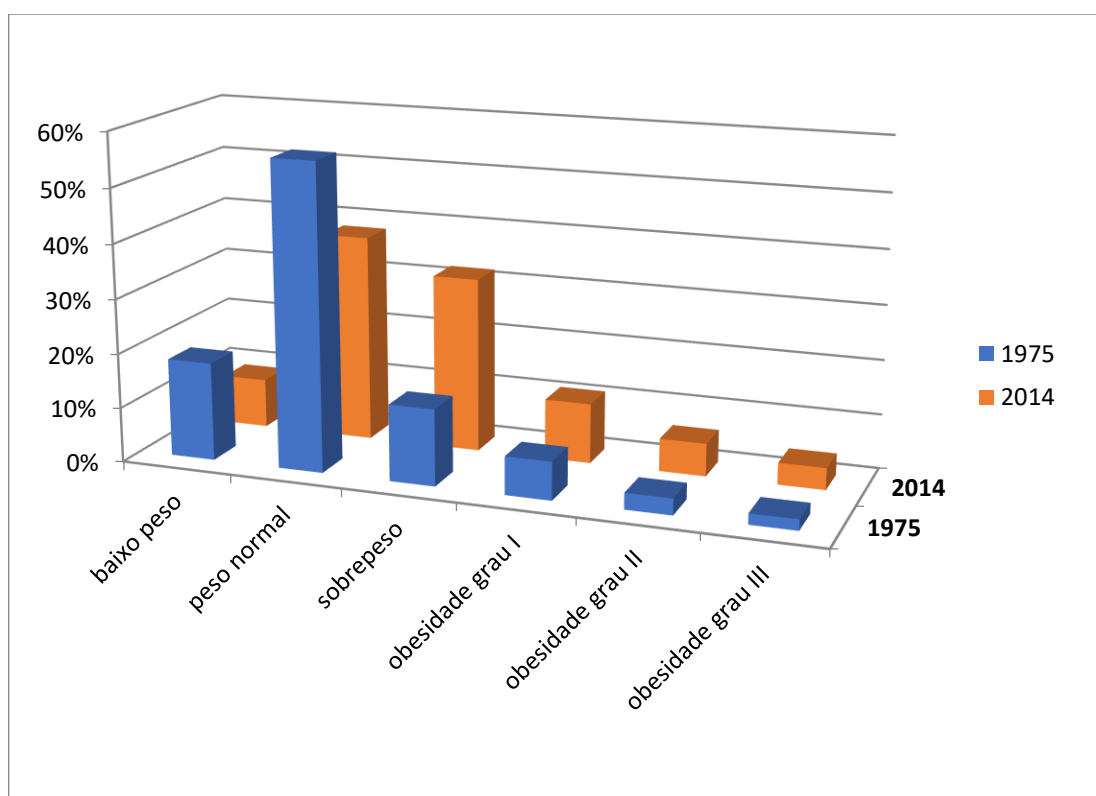


Figura 1. Epidemiologia global da obesidade. Avaliação epidemiológica da população mundial entre os anos de 1975 até 2014, mostrando globalmente redução dos indivíduos com baixo peso e peso normal e um importante incremento dos indivíduos com sobrepeso e obesidade nas últimas décadas.<sup>(2)</sup>

Apesar deste aumento na prevalência global da obesidade, é importante ressaltar que, do ponto de vista epidemiológico, o excesso de peso também tem importante relação com a etnia. No gênero masculino, a prevalência da obesidade é maior entre os afrodescendentes (38,0%) e hispânicos (37,9%). No gênero feminino, a prevalência da obesidade é maior entre as afrodescendentes (57,2%) e hispânicas (46,9%). Independente do gênero, a etnia com menor prevalência de obesidade ocorre entre os asiáticos.<sup>(15)</sup>

No Brasil, seguindo essa tendência mundial, é notado diminuição dos indivíduos que apresentam baixo peso e importante aumento no número de pessoas com sobrepeso e obesidade, em todas as faixas etárias. Comparando-se os dados de 1975 a 2014, entre os homens, o país passou da décima para a terceira colocação em números absolutos de indivíduos com obesidade. Entre as mulheres, neste mesmo período, o Brasil passou da nona para a quinta posição (Figura 2).<sup>(2)</sup>

De forma geral, os dados epidemiológicos mostram aumento de 75% nos casos de obesidade entre os brasileiros na última década. Sobre os dados brasileiros, vale ressaltar alguns fatos como a miscigenação das etnias e programas governamentais que surgiram com o intuito de erradicar a fome e a desnutrição.<sup>(2)</sup>

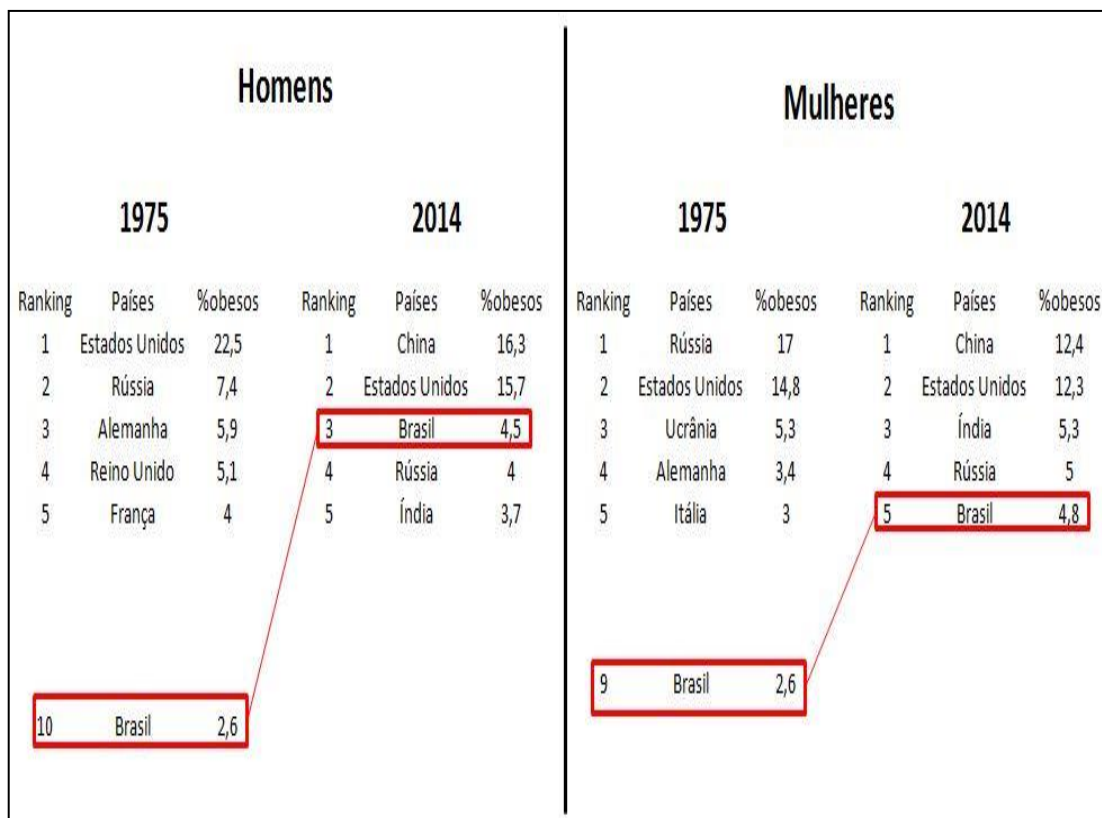


Figura 2: Ranking dos países com números relativos de pacientes com obesidade entre 1975 e 2014. Homens e mulheres com obesidade com destaque para o importante aumento da porcentagem de indivíduos com obesidade no Brasil nas últimas quatro décadas.<sup>(2)</sup>

Dados do Ministério da Saúde de 2019 mostram que, em média, mais da metade da população adulta brasileira apresentava excesso de peso, ou seja,  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ . Entre os gêneros, o excesso de peso ocorre em 57,1% do sexo masculino e 53,9% do sexo feminino. Em relação à obesidade, ou seja,  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , esteve presente, em média, em 20,3%, e igualmente distribuída entre os gêneros.<sup>(16)</sup>

Dados mais atuais da Federação Mundial da Obesidade apontam que, em 2020, globalmente, tínhamos cerca de 3,5 bilhões de pessoas com excesso de peso (sobrepeso ou obesidade). Fazendo uma projeção para o

ano de 2035, este número irá ultrapassar os quatro bilhões, ou seja, um aumento de 38% para 50% da população mundial. Estima-se que, nos próximos quinze anos, os gastos globais relacionados à obesidade atinjam aproximadamente quatro trilhões de dólares. Nessa mesma projeção epidemiológica para o ano de 2035, o Brasil apresenta uma avaliação de muito alto risco para a prevalência da obesidade (cerca de 41% da população adulta), um crescimento anual de adultos com obesidade de 2,8% (alto risco), um crescimento de 4,4% (muito alto risco) entre as crianças e adolescentes e um importante aumento dos gastos com a doença.<sup>(15)</sup>

## **1.5 Características Gerais do Câncer de Mama**

Com exceção dos tumores malignos de pele não-melanoma, no Brasil, o CM é a neoplasia mais comum no sexo feminino. Em 2020, foram 66.280 novos casos (29,7% de todas as neoplasias malignas entre as mulheres). No ano de 2019, o CM resultou em 18.068 óbitos representando 16,4% dos óbitos causados por carcinomas entre pacientes do sexo feminino.<sup>(17)</sup> Dados da IARC (Agência Internacional para Pesquisa no Câncer) apontam o CM como a quinta causa de câncer no mundo e no ano de 2020 essa neoplasia teve cerca de 2,3 milhões de novos casos e 685.000 óbitos relacionados a este tipo de câncer.<sup>(18,19)</sup>

A forma mais prevalente de CM é o carcinoma ductal invasivo, responsável por cerca de 70 a 80% dos casos. Este tipo de câncer tem a

capacidade de afetar o tecido conjuntivo adjacente, resultando em diferentes apresentações clínicas, tais como retração ou abaulamento de pele. Estas alterações podem ser bastante visíveis durante o auto exame ou exame físico. Ao ser palpado, o carcinoma ductal invasivo, geralmente, apresenta consistência endurecida. Infelizmente, esse tipo de câncer tem prognóstico desfavorável e há possibilidade de metástase, especialmente, para pulmão, osso e fígado.<sup>(20)</sup>

Além da classificação histológica, o CM possui importante fator prognóstico associado a aspectos genéticos e da avaliação pelo imuno-histoquímica (IHQ) da lesão, caracterizada como classificação fenotípica. A presença de receptores hormonais (RH), como os receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), é um fator crucial relacionado ao tratamento e à sobrevida das pacientes com CM.<sup>(17)</sup>

A presença do receptor do fator de crescimento humano epidérmico (HER2), sintetizado a partir de um oncogene localizado no cromossomo 17, ocorre em aproximadamente 25 a 38% dos casos de CM e está associada a um prognóstico desfavorável para o CM. Adicionando a avaliação do grau de expressão do Ki-67, o CM pode ser também subclassificado pelas denominações luminal A (RE e RP fortemente positivos, HER2 negativo e Ki-67 baixo), luminal B (RE positivo, RP positivo ou negativo, HER2 negativo e Ki-67 alto), HER2 positivo (HER2 positivo independente dos outros resultados) e triplo negativo (avaliação negativa para RE, RP e HER2 com alto grau de Ki-67).<sup>(17)</sup>

Apesar da ampla utilização desses últimos dados de IHQ nas avaliações de pacientes com CM, sabe-se que a baixa expressão da E-caderina, uma molécula de adesão que fornece integridade ao tecido, codificada pelo gene *CDH1*, um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 16, está comumente associado aos carcinomas ductais invasivos e tem forte correlação com a presença de metástases.<sup>(21,22)</sup>

Os principais fatores de risco associados ao CM podem ser divididos em três categorias distintas. Em relação a história reprodutiva os principais fatores de risco são a menacme antes dos 12 anos de idade, menopausa após os 55 anos de idade, nuliparidade e uma possível associação com a terapia de reposição hormonal. A segunda situação de fator de risco é a presença do histórico familiar de CM em parente de primeiro grau, especialmente antes dos 50 anos de idade. A terceira situação são os fatores ambientais e aqui destacamos a exposição à radiação ionizante e o excesso de peso, especialmente, no período pós-menopausa.<sup>(23)</sup>

Em revisão recente que analisou diversos estudos nos últimos cinco anos, envolvendo mais de um milhão de pacientes, foram identificados vários fatores de risco para o CM. Entre esses fatores, destacam-se a obesidade assim como a idade avançada, histórico familiar de CM, uso de contraceptivos orais, histórico de menopausa, tabagismo, etilismo, hábitos de vida e fatores genéticos.<sup>(24)</sup> Em um estudo sobre a exposição a 87 diferentes fatores de risco para diferentes doenças, em 87 países, entre os anos de 2010 a 2019, foi notado diminuição para alguns fatores de risco, como o tabaco, mas, por

outro lado, houve aumento para outros fatores de risco, especialmente, o excesso de peso.<sup>(25)</sup>

Mulheres com obesidade no período pós menopausa tem maior risco do surgimento do CM, especialmente aquelas que apresentam o valor do IMC compatível com obesidade grau II e obesidade grau III.<sup>(26)</sup> Na avaliação da correlação entre CM e obesidade, entre as mulheres que se encontram no período pós menopausa, o aumento na razão do risco para o surgimento dessa neoplasia é significativa e pode variar conforme o subtipo do CM. O período que confere maior risco para que a obesidade tenha influência direta no surgimento do CM não é bem estabelecido, mas parece haver aumento de risco com o avançar da idade e quando este aumento de peso ocorre após o início da menopausa.<sup>(25,26)</sup>

Em uma avaliação por IHQ, a obesidade no período pós menopausa está mais relacionada a subtipos de CM com receptores hormonais positivos e também tumores considerados triplo negativos pela IHQ.<sup>(27)</sup> As alterações hormonais, o aumento de citocinas inflamatórias e a ativação de vias moleculares associadas à obesidade desempenham um papel fundamental na carcinogênese mamária em pacientes com sobrepeso ou obesidade.

## **1.6 Carcinogênese e Obesidade**

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo aumento do peso, mais precisamente do aumento do tecido adiposo. Os adipócitos, mais

especificamente os do tecido adiposo branco, são células que possuem uma grande e única gota lipídica no seu citoplasma e apresentam o seu núcleo localizado na periferia da célula.<sup>(12,28)</sup>

Além dos adipócitos, que representam 50% do número de células e 96% do volume celular do tecido adiposo, este tecido também é composto por outros tipos de células como pré-adipócitos, células-tronco derivadas do adipócito, fibroblastos e células do tecido imunológico como macrófagos, eosinófilos e linfócitos.<sup>(18)</sup> Na glândula mamária das mulheres, o tecido adiposo pode representar de sete a 56% do volume total da mama.<sup>(29)</sup>

Por décadas, o tecido adiposo foi considerado um órgão inerte que tinha como principal função o estoque de lipídeos. Além de estocar energia na forma de triacilglicerol; o tecido adiposo, de uma maneira geral, tem outros papéis fundamentais nos seres vivos como proteção de vísceras, deslizamento de feixes musculares, termogênese e é responsável pela secreção de diversas substâncias e hormônios, chamadas de adipocinas. A partir da década de 90, com a descoberta das adipocinas, o tecido gorduroso passou a ser considerado o maior órgão endócrino do corpo humano devido a importância da secreção dessas substâncias.<sup>(30)</sup>

A primeira adipocina descoberta foi a leptina, um peptídeo secretado principalmente pelo tecido adiposo branco que tem como principal objetivo o controle do apetite atuando em receptores do núcleo arqueado cerebral, diretamente no centro de controle da fome. Após isso, novas adipocinas foram descobertas e investigadas. Algumas adipocinas, como a adiponectina,

apresentam um perfil anti-inflamatório que melhoram a sensibilidade a insulina, especialmente no tecido gorduroso.<sup>(31)</sup>

Por outro lado, o tecido adiposo do paciente com obesidade, infiltrado por macrófagos e outras células inflamatórias, podem secretar citocinas pró inflamatórias que aumentam a resistência à insulina e à leptina, liberam ácidos graxos livres, aumentam o risco de eventos tromboembólicos e incrementam o risco para o surgimento de outras doenças metabólicas crônicas como o DM2, HAS, DLP e DCV.<sup>(31,32)</sup>

A obesidade está fortemente relacionada com a resistência a ação da insulina e da leptina. A resistência a esses hormônios nos seus receptores tirosinoquinase (RTKs), associada a um quadro de hipóxia tecidual, estão correlacionados com o aumento de vias moleculares de inflamação e, conseqüentemente, o aumento da produção de substâncias pró inflamatórias como interleucinas (como a IL-1 e IL-6), o fator nuclear kappa B (NF-κB) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α).<sup>(6,14)</sup>

A resistência destes mesmos hormônios também está correlacionada com o aumento de fatores de crescimento como fator de crescimento insulina-like tipo 1 (IGF-I) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O conhecimento dessas vias moleculares é importante para compreender a fisiopatologia da obesidade, o surgimento de outras doenças e o seu papel na carcinogênese.<sup>(6,14,33,34)</sup>

A obesidade aparece como um importante fator de risco para o surgimento de alguns tipos de neoplasias, especialmente tumores ginecológicos, especialmente o CM.<sup>(35)</sup> No caso do CM, existe correlação

direta não apenas com a composição de gordura corporal total, mas o acúmulo de gordura visceral tem um importante papel fisiopatológico no surgimento e na evolução desta doença.<sup>(14,36)</sup>

Dados epidemiológicos americanos mostram que, entre os anos de 2005 e 2014, as neoplasias relacionadas à obesidade e ao sobrepeso aumentaram 7% enquanto que, as neoplasias que não estão relacionadas ao excesso do peso diminuíram 13% neste mesmo período. Mais de 684.000 neoplasias malignas relacionadas a obesidade e o sobrepeso ocorrem a cada ano nos Estados Unidos, sendo que 470.000 ocorrem entre as mulheres e, a maioria dos casos neste gênero, são de CM em uma idade compatível com o período pós-menopausa<sup>(4)</sup>

Vias moleculares de inflamação, resistência à insulina e leptina e o aumento de fatores de crescimento estão correlacionados não só à carcinogênese, mas também ao prognóstico da doença. A maior ativação destas vias culmina em maior ativação da aromatase (Figura 3).<sup>(14,37,38)</sup>

A aromatase é a enzima responsável pela conversão de andrógenos, como a testosterona, em estrógeno, como o estradiol. Em humanos, é expressa em diversos tecidos como gônadas, glândula adrenal e células mesenquimais do tecido adiposo e a sua expressão aumenta com o avanço da idade e na obesidade, o que se correlaciona clinicamente com o fato da obesidade ser um importante fator de risco para o CM.<sup>(38)</sup>

Pesquisas apontam que, além disso, alterações moleculares relacionadas à obesidade como o aumento do fator  $1\alpha$  induzido por hipóxia (HIF- $1\alpha$ ) e prostaglandina E2 (PGE2), e também citocinas relacionadas à

resistência insulínica como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), algumas interleucinas, a hiperleptinemia e uma maior ativação de receptores *toll-like* 4 por aumento de ácidos graxos livres na circulação (via aumento de NF- $\kappa$ B), com um importante papel de macrófagos e fibroblastos. Podem gerar conseqüentemente aumento da expressão e atividade da aromatase e maior concentração de estrógenos não somente no tecido adiposo visceral e subcutâneo, mas também na gordura do tecido mamário.<sup>(14,37-39)</sup>

Este ambiente pró inflamatório faz com que o sobrepeso, obesidade, resistência insulínica, a síndrome metabólica e a presença de algumas doenças associadas, como o DM2 e a síndrome dos ovários policísticos tenham um papel no estabelecimento de um eixo “obesidade-inflamação-aromatase”. Por este motivo, inibidores da aromatase são utilizados em terapias hormonais para o tratamento de certos tipos de CM, com o objetivo de reduzir a produção de estrógeno e, assim, inibir o crescimento tumoral.<sup>(40)</sup>

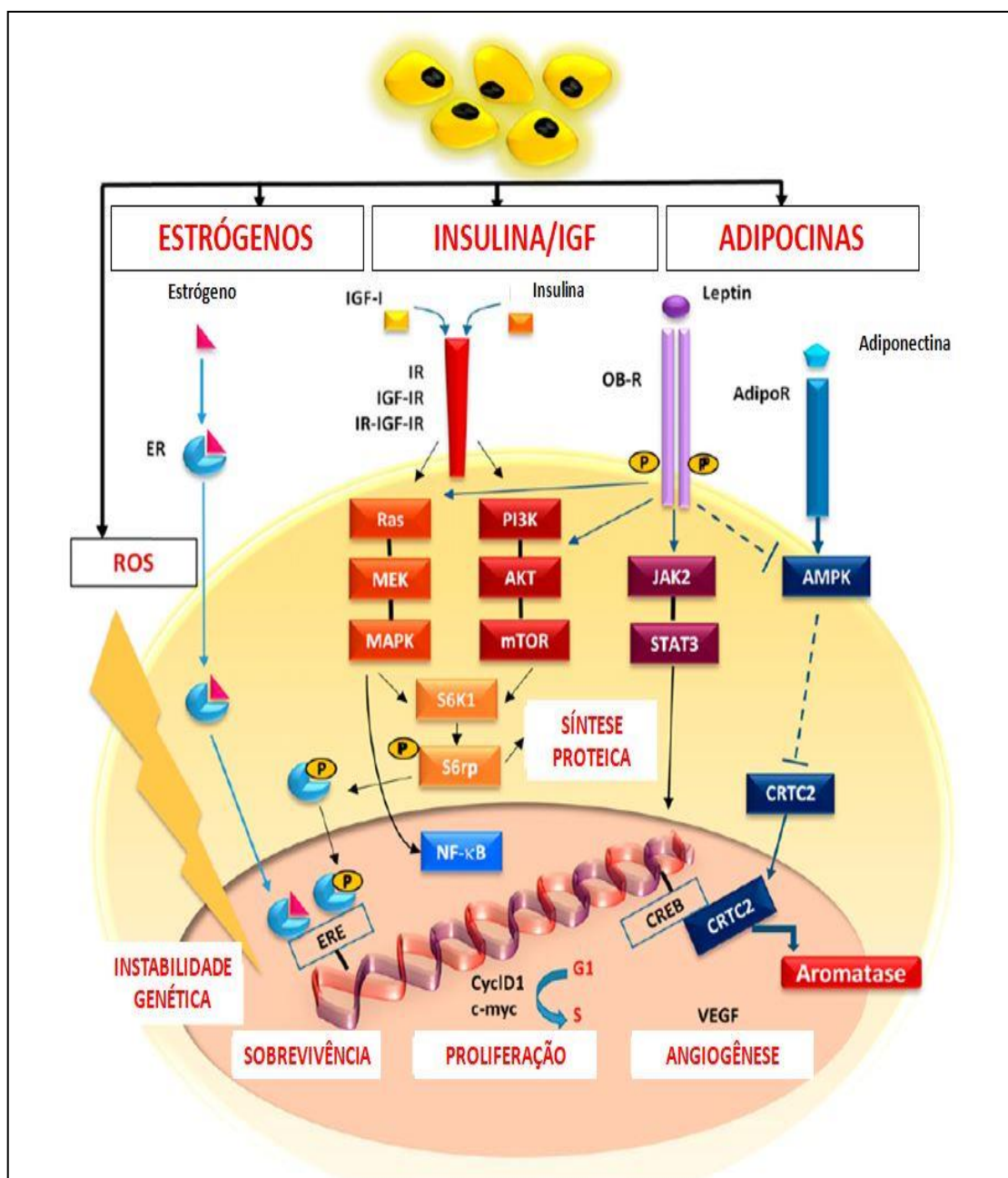


Figura 3: Vias moleculares e inflamatórias da carcinogênese na obesidade. Vias moleculares ativadas demonstrando a relação entre o câncer de mama e obesidade. Alterações nos níveis de estrógeno, as vias relacionadas com o eixo insulina/IGF e com as adipocinas (hiperleptinemia e a hipoadiponectinemia), por diferentes vias intracelulares desencadeando aumento na produção de aromatase.<sup>(14)</sup> Legenda: AKT (proteína quinase B), ER (receptor de estógeno), IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina), mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), VEGF (fator de crescimento vascular epitelial).

## 1.7 Genética, Vias Moleculares da Obesidade e Câncer de Mama

O rastreio e o diagnóstico precoce são importantes estratégias no tratamento do CM. Além do autoexame e o exame físico, a mamografia é o exame complementar mais importante no diagnóstico do CM. O Ministério da Saúde (MS) e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) recomendam a realização da mamografia bianual em mulheres entre 50 e 69 anos.<sup>(41)</sup> Em outras diretrizes, como o da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO), recomenda-se o rastreamento anual para mulheres entre 40 e 74 anos e também reforça a importância da genética na avaliação do CM (FEBRASGO, 2018).<sup>(42)</sup>

Um das principais variantes genéticas patológicas relacionadas ao CM são as mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Os genes *BRCA1* (17q21) e o *BRCA2* (13q13) são genes supressores tumorais com importante papel no reparo do DNA. Na diretriz de rastreamento da FEBRASGO, além da pesquisa na população geral, o órgão também recomenda uma investigação para mulheres de alto risco, entre elas, as que apresentam mutações e alterações genéticas previamente conhecidas.<sup>(41,42)</sup>

Mulheres com mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* ou com parentes de primeiro grau com a mutação comprovada devem realizar a mamografia anual a partir dos 30 anos de idade.<sup>(42)</sup> Na obesidade, o aumento da atividade da aromatase em pacientes com mutações *BRCA1* e *BRCA2* parece estar relacionado com o surgimento do CM em mulheres no período pós-menopausa.<sup>(43)</sup>

A mutação do *CDH1* é muito prevalente entre as mulheres com carcinoma ductal invasivo. A mutação do gene *CDH1*, responsável pela síntese das E-caderinas, está correlacionada com pior prognóstico pelo maior risco de metástases. Além da associação com o CM, esta mutação também apresenta importante grau de correlação com a obesidade.<sup>(44)</sup>

Do ponto de vista clínico, a obesidade tem grande impacto na carcinogênese do CM, especialmente, em mulheres pós-menopausa.<sup>(45-47)</sup> Em uma grande coorte do Reino Unido que avaliou mais de 1 milhão de mulheres entre 50 e 64 anos, incluindo 45.037 pacientes com CM, foi identificado aumento de 30% no risco do desenvolvimento dessa doença em mulheres que apresentavam obesidade (RR, 1.29; IC 95%, 1.22 - 1.36).<sup>(48)</sup>

Em meta-análise de 34 estudos com mais de 2,5 milhões de mulheres, incluindo 23.909 pacientes com CM pós menopausa, mostrou correlação positiva entre o risco de CM pós-menopausa e o aumento para cada 5 kg/m<sup>2</sup> no valor do IMC (RR, 1.12; 95% IC, 1.08 – 1.16 com  $p < 0,0001$ ).<sup>(49)</sup> Além de ser um fator de risco independente para o desenvolvimento do CM, a obesidade também foi um fator de risco independente para o CM em mulheres que não fizeram uso de terapia de reposição hormonal no período pós-menopausa.<sup>(50,51)</sup> O aumento do peso acontece em mais da metade das pacientes após o diagnóstico do CM. Pacientes que apresentam um incremento de mais de seis quilogramas no peso corporal apresentam um risco 1,6 maior de mortalidade<sup>(52)</sup> e, isoladamente, a presença da obesidade em mulheres com diagnóstico de CM diminui a taxa de sobrevida<sup>(53-55)</sup> Mulheres com IMC compatível com obesidade grau III têm risco duas vezes

maior de mortalidade pelo CM quando comparado a uma paciente com IMC normal.<sup>(53)</sup>

Outro aspecto importante é a avaliação molecular da obesidade e o risco do CM. A produção de citocinas inflamatórias e adipocitocinas pró-inflamatórias tem importante relação com a carcinogênese do CM e também apresentam associação com o gene *CDH1* e a codificação das E-caderinas.<sup>(14,47)</sup>

A obesidade é uma doença crônica e multifatorial e, além de alterações genéticas relacionadas com a predisposição ao ganho de peso (como a do gene *FTO*, citado anteriormente), outras variantes são de extrema importância nessa complexa fisiopatologia. Além dos genes mais comumente relacionados a obesidade, algumas alterações genéticas associadas ao CM também apresentam correlação com o aumento do peso. Por exemplo, a mutação do gene *CDH1* e a baixa expressão da E-caderina têm importante relação com o aumento do peso por alterações na absorção intestinal e na sua microbiota<sup>(56)</sup>, piora do perfil inflamatório associado com a obesidade<sup>(57)</sup> e também é correlacionada com o DM2<sup>(58)</sup>, síndrome metabólica e síndrome do ovário policístico.<sup>(59)</sup>

A obesidade e as suas alterações moleculares levam a um estado pró inflamatório, pró-angiogênica e pró-mitogênica. A hiperleptinemia, hiperinsulinemia e a diminuição do processo de maturação de pré-adipócitos para adipócitos maduros cria uma situação de hipóxia que induz mudanças na expressão gênica dos adipócitos o que perpetua um microambiente de inflamação. Este aumento da inflamação no paciente obeso induz lipólise e,

consequentemente, liberação de ácidos graxos livres que estimulam receptores *toll-like* (TLR) que ativam a via do NF- $\kappa$ B em adipócitos e macrófagos.<sup>(14,38)</sup>

O aumento da expressão da via NF- $\kappa$ B ativa a expressão de genes inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  que, por sua vez, ativam ainda a via inflamatória do NF- $\kappa$ B.<sup>(14,47,60)</sup> Além da inflamação, a ativação crônica da via do NF- $\kappa$ B também aumenta a expressão de genes que estão associados a proliferação, invasão e metástase no CM.<sup>(61)</sup>

## **1.8 Adesão celular, Obesidade e Câncer de Mama**

O gene *CDH1*, localizado do braço curto do cromossomo 16 (16p22.1) é responsável pela codificação das E-caderinas, proteínas transmembrana que funcionam como moléculas de adesão entre as células. A E-caderina desempenha papel fundamental na manutenção da coesão entre as células epiteliais, contribuindo para a integridade do tecido. A perda ou diminuição da expressão da E-caderina pode levar a menor adesão entre as células e promover a transição de células epiteliais para um estado mesenquimal, conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM). Essa molécula tem um importante papel como supressora tumoral e a sua perda de função está relacionada com aumento na expressão das N-caderinas e da Vimentina (VIM), configurando o fenótipo mesenquimal. Esse processo está envolvido na progressão tumoral, uma vez que células tumorais adquirem

características mais invasivas e metastáticas. Por este motivo, a baixa expressão do gene *CDH1* está relacionado a diversos tipos de carcinomas como esôfago, estômago, cólon, próstata e mama.<sup>(62-66)</sup>

A baixa expressão da E-caderina pode ser resultado de mutações no gene *CDH1*. Essas mutações estão associadas não apenas com a carcinogênese, mas também ao grau de invasão tumoral, devido às alterações na transição epitélio-mesenquimal. No CM, a mutação deste gene surge como um importante fator de risco de invasão pela perda da junção entre as células epiteliais da glândula mamária, especialmente, em carcinomas ductais invasivos.<sup>(66)</sup>

No CM, a regulação da E-caderina está associada como um inibidor das metástases. Atualmente, variantes genéticas do *CDH1* estão presentes em cerca de metade dos casos de carcinomas lobulares invasivos.<sup>(44,67)</sup> Além de diversas variantes genéticas, alterações epigenéticas vem surgindo com causas de prejuízos na expressão e da função da E-caderina em diversos tipos de CM e determinando pior prognóstico.<sup>(68)</sup>

A perda da expressão de genes epiteliais e uma ativação de um perfil mesenquimal também estão relacionadas com o aumento de moléculas, como o *zinc-finger E-box-binding* (ZEB). Estudos de IHQ demonstram níveis altos de ZEB1 em casos de CM invasivo. A maior expressão proteica do ZEB1 também está relacionada com metástase para linfonodos, estágios mais avançados da doença e pior prognóstico.<sup>(44,69-71)</sup>

Estudo em pacientes com obesidade e carcinoma colorretal, além de mostrar correlação com baixa expressão da E-caderina, também evidenciou

correlação inversa entre a expressão do RNAm dessa proteína de junção celular com a expressão do RNAm de citocinas inflamatórias, como a IL-6, que reforça a associação entre um estado inflamatório na relação entre obesidade e carcinogênese.<sup>(57)</sup>

Neste padrão mesenquimal, ocorre uma maior expressão proteica da Vimentina, em correlação inversamente proporcional com a E-caderina.<sup>(57)</sup> O aumento da expressão da leptina está diretamente relacionado com alterações na transição epitélio-mesenquimal e maior risco de invasão e progressão do CM.<sup>(18)</sup>

## **1.9 Inflamação, Obesidade e Câncer de Mama**

A obesidade é considerada uma doença inflamatória crônica devido a infiltração de células do sistema inflamatório no tecido adiposo, principalmente o tecido adiposo visceral, e a secreção de diversas adipocinas pró-inflamatórias.<sup>(6,14,34,72)</sup>

Entre as interleucinas, nos últimos anos, a família das interleucinas 17 vem aparecendo com um importante papel na fisiopatologia da obesidade, do CM e da relação entre essas doenças. A superfamília das interleucinas 17 produzida especialmente por células T *helper* 17 (Th17), mas também por células natural killers,  $\gamma$ GT, CD4+ e CD9+, é composta por seis ligantes: a IL-17A (ou IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também conhecida como IL-

25) e IL-17F. Destas daremos destaque para a IL-17B e a IL-17E que competem pelo mesmo receptor, o IL-17RB.<sup>(73,74)</sup>

Do ponto de vista oncológico, especialmente, o CM, a IL-17B apresenta comportamento pró-inflamatório e colabora para a progressão e metástases no CM. O aumento da expressão de IL-17B e seu receptor (IL-17RB) está relacionado com pior prognóstico neste tipo de neoplasia e o aumento de TNF- $\alpha$ , HIF-1 e ativação das vias NF- $\kappa$ B, ERK1/2 e outras interleucinas (como a interleucina 8), promovendo inibição de apoptose, crescimento celular, proliferação e a migração de células do tumor mamário. Por outro lado, a IL-17E (ou IL-25) produzidas por Th2, especialmente, nas células do epitélio mamário normal, tem efeito antitumoral com aumento de apoptose caspase-mediada em células de CM. No câncer, de uma maneira geral, IL-17B e IL-17E tem efeitos opostos.<sup>(74)</sup>

Na superfamília das interleucinas 17, a IL-17B parece ter homologia na função com aIL-17A. Em relação a obesidade, a IL-17A parece desenvolver o papel mais pró-inflamatório em relação a todos os outros ligantes. A IL-17A, que também está relacionada com quimiorresistência no tratamento do câncer de mama<sup>(75)</sup>, também está envolvida no estado inflamatório de baixo grau relacionado ao aumento de peso, inibe a adipogênese (via C/EPB $\alpha$  e PPAR-gama) e piora o metabolismo de glicose e lipídeos em células do tecido gorduroso.<sup>(76)</sup>

Por outro lado, assim como no CM, a IL-17E (ou IL-25) parece exercer um efeito contrário sobre o metabolismo do tecido adiposo. Assim como no CM na qual inibe o surgimento de metástases, a IL-25 melhora o metabolismo

de lipídeos através do processo de “beigificação” do tecido gorduroso branco, ou seja, aumentando o número de mitocôndrias neste tipo de célula adiposa.<sup>(77)</sup>

Assim como as baixas temperaturas, através da atuação da IL-17E no IL-17RB, ocorre a secreção de IL-4 e IL-13 por macrófagos tipo 2 (M2) e aumento na produção de catecolaminas que, por atuação em receptor  $\beta$ 3-adrenérgicos, promovem lipólise, termogênese e perda de peso mediada por melhora na capacidade respiratória mitocondrial em modelos animais e, pode ser um novo alvo terapêutico no tratamento da obesidade e da síndrome metabólica.<sup>(78,79)</sup>

Outra interleucina que está correlacionada com obesidade e carcinogênese é a interleucina 8 (IL-8). Além da obesidade, o aumento da expressão da IL-8 também está correlacionado com complicações relacionadas com o aumento do tecido gorduroso como a esteatose hepática e DM2.<sup>(80,81)</sup> O aumento de peso, uma dieta rica gordura e obesidade mostram correlação do aumento da expressão da IL-8 e o surgimento de neoplasias malignas em modelos animais e também em humanos.<sup>(82,83)</sup>

Além da correlação entre obesidade e a carcinogênese, a IL-8 também está relacionada com pior prognóstico e importante correlação com o CM. Não apenas a IL-8, mas outras interleucinas pró-inflamatórias se encontram em níveis elevados na fisiopatologia da obesidade, mas também em doenças metabólicas associadas como o DM2, HAS e DLP.<sup>(84)</sup>

O aumento da produção desta e de outras interleucinas pró-inflamatórias também tem relação positiva com o estágio dessa neoplasia.<sup>(85)</sup> Uma recente

forma de imunoterapia no tratamento do CM, especialmente, no CM triplo negativo, o tocilizumabe, apresenta importante inibição da IL-8 e com potente ação na redução tumoral por inibição da angiogênese.<sup>(86)</sup>

### **1.10 Crescimento Tumoral, Obesidade e Câncer de Mama**

As vias moleculares da obesidade têm importante impacto no crescimento tumoral.<sup>(6,14,33,34)</sup> Hiperinsulinemia como a hiperleptinemia são alterações atreladas a obesidade, estão diretamente relacionadas com uma maior ativação da via molecular PI3K/AKT/mTOR e, conseqüentemente, maior síntese proteica e aumento da angiogênese (VEGF) e proliferação celular.<sup>(14)</sup> A maior ativação dessa via e expressão de proteínas, como a AKT, estão relacionadas não apenas com a obesidade, mas também com outras alterações metabólicas como DM2, HAS, DLP e DCV.<sup>(87)</sup>

Na carcinogênese, a hiperexpressão da AKT-fosforilada vem sendo foco de diversas pesquisas, especialmente no CM. Uma meta análise sobre o tema aponta que essa hiperexpressão tem relação direta com pior prognóstico no CM com altas taxas de mortalidade e maiores chances de recorrência da doença.<sup>(88)</sup> Estudo *in vitro* sugere que as adipocinas relacionadas com a obesidade, em mulheres pós menopausa, acarreta em maior estímulo de receptores estrogênicos alfa (ER $\alpha$ ) e, conseqüentemente maior ativação de vias moleculares, como PI3K/AKT/mTOR, e isso estava diretamente relacionado com maiores taxas de mortalidade e crescimento

celular, sugerindo maior resistência a terapia endócrina em pacientes com CM e excesso de peso.<sup>(89)</sup>

A metformina, uma medicação sensibilizadora de insulina utilizada no tratamento do DM2, quando prescrita para mulheres com CM, demonstrou redução da AKT-fosforilada e possível efeito antitumoral. Estudos de meta análise demonstraram que um dos principais mecanismos de falha terapêutica do CM está relacionado com a via PI3K/AKT/mTOR e o uso de inibidores da PI3K/AKT vem sendo realizados, especialmente em pacientes com CM e resistência ao tratamento inicial como uma terapia de segunda linha.<sup>(90-92)</sup>

Recentemente, foi aprovado no Brasil, o uso de um inibidor da isoforma alfa da PI3K (o alpelisibe) para pacientes com CM metastático e que apresentam RH-positivos em combinação ao fulvestranto (um antagonista do receptor estrogênico), especialmente, em mulheres que apresentavam a mutação *PIK3CA*.<sup>(93)</sup> Outra medicação recentemente analisada em combinação com o fulvestranto é um inibidor da AKT (o capivasertibe) para o tratamento do CM com receptores hormonais positivo apresentando maiores taxa de sobrevida.<sup>(94)</sup>

A resistência à ação da insulina e da leptina em pacientes obesos está relacionada diretamente com a ativação de diferentes vias moleculares e, uma das alterações correlatas é a maior expressão do VEGF.<sup>(14,88)</sup> Na carcinogênese do CM, a correlação com os polimorfismos do *VEGF* é incerta.<sup>(95)</sup> A expressão do *VEGF* em pacientes com CM também é controversa de acordo com o tipo de população estudada, mas alguns

estudos destacam que a maior expressão do *VEGF* teria relação com o crescimento do tumor e prognóstico mais desfavorável.<sup>(96,97)</sup> Apesar do seu uso limitado ao CM metastático, especialmente, HER2-negativo, o bevacizumabe, um anticorpo monoclonal anti-VEGF, tem benefícios controversos no tratamento do CM.<sup>(98,99)</sup>

A obesidade é um estado de inflamação crônica e o tecido gorduroso, especialmente, o tecido adiposo branco visceral, é a principal fonte de aumento na produção de citocinas pró inflamatórias, fatores de crescimento e de adesão e a aromatase.<sup>(96,100)</sup> A obesidade é o fator determinante para o surgimento de doenças como DM2, HAS e DLP que, quando associadas, representam a síndrome metabólica. Assim como a obesidade, as doenças que compõem a síndrome metabólica têm importante associação com alterações de vias moleculares, aumento da produção de substâncias pró-inflamatórias e as mesmas alterações descritas acima em relação a fatores de crescimento e de adesão celular e, conseqüentemente, um maior risco do surgimento de neoplasias, como o CM.<sup>(14,44)</sup>

Em contrapartida, assim como o tratamento de perda de peso, diferentes formas de terapias para controle da glicemia, pressão arterial e os níveis de lipídeos estão associados com melhora do perfil molecular, diminuição da resistência à insulina e redução da inflamação. A melhor compreensão sobre essas vias moleculares que ocorrem não apenas na obesidade, mas também em toda a síndrome metabólica, pode ser também crucial no diagnóstico, prognóstico e no desenvolvimento de novas terapias adjuvantes para pacientes com CM e obesidade.<sup>(14)</sup>

## **2. Objetivos**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O estudo busca aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares que conectam a obesidade e o CM através da análise da expressão gênica e proteica de vias-chave relacionadas à adesão celular, inflamação e crescimento/angiogênese tumoral em mulheres afetadas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Relacionar a expressão gênica e proteica de vias relacionadas à adesão celular, inflamação e crescimento tumoral em mulheres com obesidade e CM;
- Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na condição de obesidade e o seu impacto na progressão do CM;
- Compreender como a expressão gênica e proteica destas vias pode estar associada à adesão celular, inflamação e crescimento tumoral;
- Identificar potenciais alvos terapêuticos ou biomarcadores relacionados à obesidade e CM.

### **3. Casuística e Métodos**

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) sob o protocolo número CAAE 83446118.5.00005415.

#### **3.2 Seleção dos Genes Candidatos**

Antes de iniciar o fluxograma da presente pesquisa, iniciamos nossos estudos em busca de genes candidatos que poderiam se correlacionar com CM e obesidade. A busca inicial por genes candidatos ocorreu em duas etapas. Inicialmente, realizamos análise pelo NGS (*Next Generation Sequencing*) e, posteriormente, outra análise *in silico* por meio de pesquisas prévias.

Na análise inicial pelo NGS, os dados foram coletados por meio de amostras de plasma e/ou fragmentos de pacientes com e sem CM em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo.<sup>(101)</sup> Foram incluídas 41 mulheres no estudo sendo 15 recém diagnosticadas com CM, 16 no grupo remissão/recidiva do CM, além de 10 mulheres no grupo controle. Durante essa avaliação inicial, foi analisado um painel de 89 genes em busca de possíveis variantes patológicas. Ao investigar prováveis genes candidatos, identificamos uma paciente no grupo remissão/recidiva com uma variante patológica previamente

descrita em casos de carcinoma esofágico e também carcinoma gástrico HER2-positivo (rs1801552) do gene *CDH1*. Além disso, outra paciente deste grupo apresentou uma variante provavelmente benigna deste mesmo gene (rs778681919) (Figura 4).

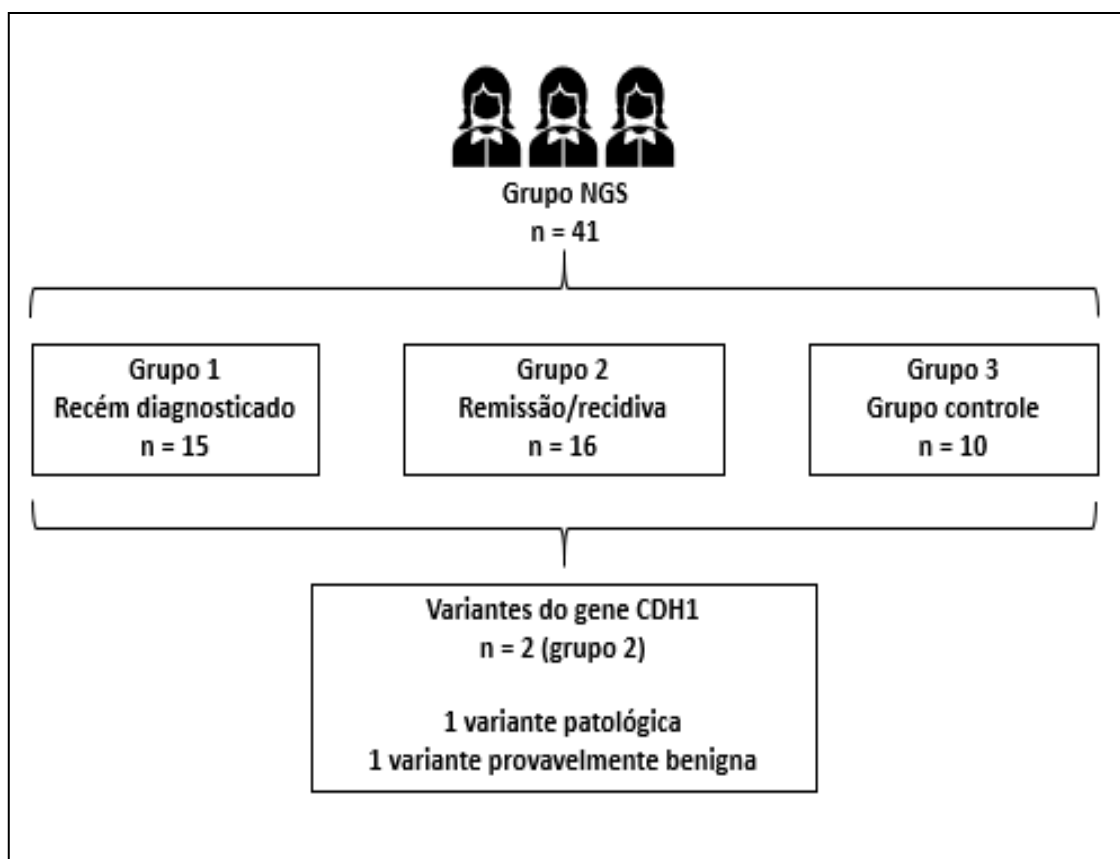


Figura 4: Fluxograma da análise de genes candidatos pelo NGS. Fluxograma da primeira etapa de pesquisa de genes correlacionados com o câncer de mama por NGS com pacientes divididas em três grupos: grupo 1 (pacientes recém diagnosticadas com CM), grupo 2 (paciente com CM prévio que estavam em remissão ou tiveram recidiva tumoral) e grupo 3 (grupo controle de mulheres saudáveis) e a localização de duas variantes relacionadas ao gene *CDH1*. Legenda: *CDH1* (gene da proteína caderina-1 ativadora de APC/C) e NGS (*next generation sequencing*)

Com este dado do NGS, selecionamos para a avaliação da expressão gênica o gene *CDH1* e, consequentemente, o gene *VIM* devido a sua relação inversa no processo da TEM. Para enriquecer ainda mais nossa pesquisa, decidimos incluir a avaliação dos genes *IL17B* e *IL8* pois ambas têm um papel pró-inflamatório no processo da obesidade, resistência à insulina e na carcinogênese do CM.

Na segunda etapa da seleção de genes candidatos, realizamos avaliação *in silico* para obter novos genes candidatos. Para essa finalidade, optamos por selecionar 23 genes candidatos em uma amostra de 405 tumores primários de mama. A análise da expressão gênica foi realizada utilizando a plataforma Affymetrix U133 2.0, utilizando RNA isolado de tecidos microdissecados a laser. As pacientes estavam classificadas de acordo com o IMC (peso normal, sobrepeso e obesidade), etnia e algumas características do tumor (avaliação IHQ dos RH e HER2) e foi utilizado o Dataset GSE78958 que foi analisado através do GEO2R.<sup>(102)</sup>

Em uma análise adicional, dividimos as participantes em dois grupos com base no IMC: obesidade (ou seja,  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) e peso normal ( $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$ ). Essa estratificação nos permitiu investigar possíveis diferenças na expressão gênica entre as mulheres com obesidade e aquelas com peso normal, enfatizando a influência do IMC nesse contexto específico. Excluímos desta amostra, as pacientes com sobrepeso (ou que não tinham a descrição do valor do IMC) e as da etnia afro-americanas, hispânicas e asiáticas (ou as que não tinham a descrição da etnia). Com isso, foram formados dois grupos: pacientes com peso normal ( $n = 101$ ) e pacientes com obesidade ( $n = 92$ ),

sendo a maioria das pacientes, de ambos os grupos, classificadas com tumores Luminal A.

A análise estatística dessa amostra foi realizada por ANOVA utilizando a plataforma *Partek Genomic Suites* versão 6.6 com um  $p < 0,05$  para definir a significância. Nesta avaliação estatística entre estes dois grupos encontramos uma diferença significativa para os genes *CDH1*, *VIM*, *BRCA1*, *IGF1*, *ESR1*, *TGFB3*, *VEGF* e *AKT*. Nesta amostra, decidimos incluir os genes *VEGF* e *AKT* em nossa análise. Os resultados desses genes reforçaram ainda mais a importância da avaliação dos genes *CDH1* e *VIM* em relação ao CM. No entanto, vale ressaltar que, em relação às interleucinas de interesse nesse estudo (IL-17 e IL-8), não observamos diferença estatisticamente significativa nessa amostra, com exceção da IL-1.

### **3.3 Seleção das Pacientes e Formação dos Grupos**

Selecionamos 40 mulheres, faixa etária acima de 18 anos de idade, com nódulos mamários em investigação no ambulatório de Mastologia do Hospital de Base em São José do Rio Preto - SP. As pacientes que aceitaram participar da pesquisa tiveram seus dados clínicos coletados, amostra de sangue e do fragmento da *core* biópsia e/ou da cirurgia. Foram coletados dados clínicos como idade, peso (no momento do diagnóstico do nódulo mamário), altura, IMC, presença de comorbidades (como DM2, HAS e DLP), uso crônico de medicações, histórico familiar de câncer de mama e se já estava no período

pós menopausa quando do diagnóstico do CM. As pacientes foram divididas inicialmente de acordo com o resultado do anatomopatológico (com e sem CM do tipo anatomopatológico ductal invasivo) e também, posteriormente, de acordo com o IMC em pacientes com obesidade (ou seja,  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) e sem obesidade (ou seja,  $\text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$ ). Ressaltando que no grupo de pacientes sem obesidade estavam incluídas pacientes com IMC compatível com sobrepeso.

Para a seleção das participantes do estudo, foram estabelecidos os critérios de inclusão específicos. Foram incluídas no estudo pacientes do sexo feminino maiores de 18 anos de idade que passaram por *core* biópsia a um nódulo mamário. A análise anatomopatológica dessa biópsia revelou a presença de carcinoma ductal invasivo ou lesão benigna. Dessa forma, a amostra selecionada é representativa e fornecerá informações valiosas sobre a relação entre o IMC e os perfis moleculares do CM.

As pacientes foram divididas em quatro grupos de acordo com o anatomopatológico (carcinoma ductal invasivo ou benigno) e IMC (com obesidade e sem obesidade): grupo 1 (mulheres com CM e com obesidade,  $n = 8$ ), grupo 2 (mulheres sem CM e com obesidade - grupo controle das pacientes com obesidade,  $n = 3$ ), grupo 3 (mulheres com CM e sem obesidade,  $n = 9$ ) e o grupo 4 (mulheres sem CM e sem obesidade - grupo controle das pacientes sem obesidade,  $n = 4$ ). As pacientes com CM (grupo 1 e 3) apresentavam um exame anatomopatológico compatível com carcinoma ductal invasivo (luminal A, luminal B, HER2 positivo ou triplo negativo). Após essa

seleção inicial, foi iniciada uma segunda etapa da pesquisa realizada através de uma análise de expressão gênica e proteica (Figura 5).

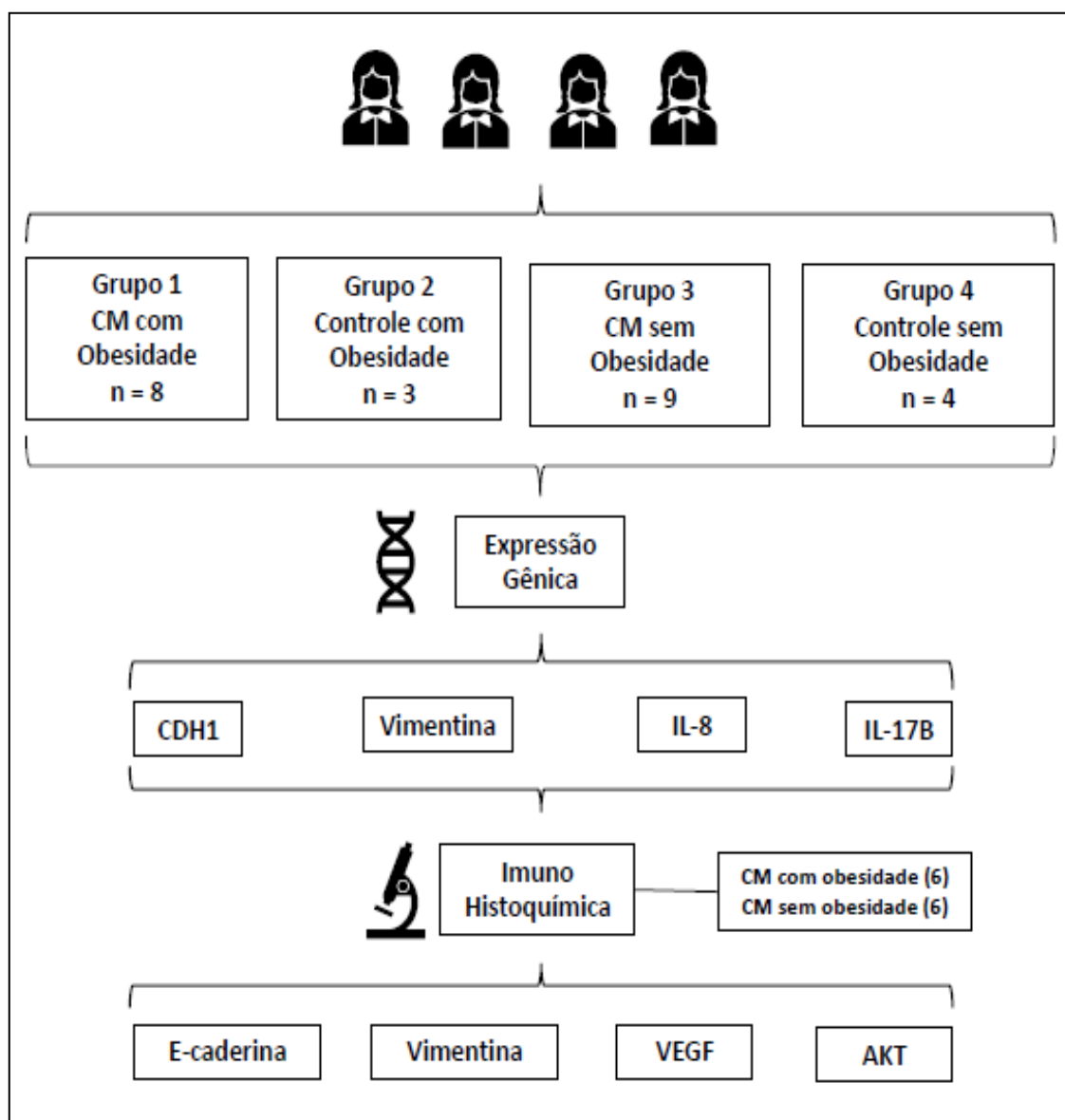


Figura 5: Fluxograma da análise da expressão gênica e proteica para avaliar a correlação entre o câncer de mama e a obesidade. Fluxograma da segunda etapa com a coleta de fragmentos tumorais de paciente selecionadas pela presença de CM e o IMC seguida da análise da expressão gênica e proteica. Legenda: AKT (proteína quinase B), CDH1 (proteína caderina-1 ativadora de APC/C), CM (câncer de mama), IL (interleucina) e VEGF (fator de crescimento vascular epitelial).

Para o cálculo do IMC, foi considerado o peso no momento do diagnóstico do nódulo mamário que estava descrito em prontuário eletrônico e, posteriormente, confirmado em anamnese com as pacientes, tanto para as pacientes com nódulos malignos, quanto também as com nódulos benignos. Foram excluídos pacientes do sexo masculino com neoplasia mamária ou mulheres com carcinoma de mama de outros subtipos no anatomopatológico que não fossem o carcinoma ductal invasivo.

Na avaliação da expressão das proteínas, selecionamos seis (das oito pacientes) do grupo com CM e com obesidade e seis (das nove pacientes) do grupo com CM e sem obesidade para a realização da IHQ da E-caderina, Vimentina (VIM), VEGF e AKT. Estas pacientes foram selecionadas de acordo com valores mais extremos do IMC e também da gravidade clínica do CM. Por fim, a análise da IHQ foi dividida em dois grupos de pacientes com CM: as pacientes com obesidade (grupo 1a) e as sem obesidade (grupo 3a).

### **3.4 Extração do RNA**

A extração do RNA da biópsia sólida seguiu a técnica descrita por Sambrook & Russel (2001) com modificações, sendo que o sucesso da técnica depende principalmente da obtenção de RNA em boa quantidade e qualidade. As amostras foram trituradas com nitrogênio líquido para obter lise celular e depois receberam 1 mL de Trizol. A próxima etapa foi a divisão das amostras em tubos limpos de 1,5 mL, sendo 1 mL para cada tubo, além de 250 µL de

clorofórmio em cada, misturando-os por um minuto e incubando por dois minutos em temperatura ambiente.

Na sequência, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o RNA permaneceu na fase superior aquosa. Essa fase foi transferida para um outro tubo de 1,5 mL limpo que também recebeu 500 µL de isopropanol para precipitação do RNA. O tubo contendo DNA e proteína foi acondicionado a -80°C. Após homogeneização manual, o tubo com RNA foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e depois submetido centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.

Após este processo, o sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de etanol 75% ao sedimento de RNA e seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Novamente, foi descartado o sobrenadante e o tubo foi colocado em capela com fluxo para secar. Após este procedimento, foram adicionados 30 µL de água DEPC (dietil pirocarbonato) e por último realizou-se a análise da razão e da concentração do material medindo-se por densidade óptica os comprimentos de onda.

### **3.5 Expressão Gênica por RT-PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)**

O RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) conforme recomendado nas instruções do fabricante. A concentração do RNA de cada amostra foi determinada usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fischer Scientific*).

O DNA complementar (cDNA) foi obtido por reação em cadeia de polimerase por ação da transcriptase reversa (RT-PCR) usando o *High Capacity cDNA Kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Uma reação qRT-PCT foi realizada em duplicata no sistema *StepOnePlus Real Time PCR* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) usando *TaqMan Universal Master Mix* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Os ensaios inventariados de TaqMan foram usados para a espécie humana fora: *CDH1* (Hs01023894\_m1), *VIM* (Hs00185584\_m1), *IL8* (Hs00174103\_m1), *IL17B* (Hs04189669\_m1) e os controles endógenos *RPLP0* (Hs99999905\_m1) e *ACTB* (Hs99999903\_m1). Cada amostra de cDNA estava em uma concentração de 100ng.

A amplificação foi realizada em ciclos a 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O valor de quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes de interesse foi determinado pelo software DataAssist 3.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), utilizando-se as médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ( $\Delta\Delta C_t$ ).

### 3.6 Análise da Expressão das Proteínas

Os fragmentos de tecido selecionados foram submetidos a técnica de IHQ para avaliação da expressão das proteínas-alvo dos genes candidatos. Após incubação em estufa a 60°C *overnight*, foi realizada a

desparafinização dos cortes em xilol seguida de hidratação com etanol em grau decrescente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada a 10 V por 30 minutos e a recuperação antigênica em panela a vapor durante 35 minutos com tampão, como indicado pelo fabricante.

O material foi incubado com anticorpo primário em câmara escura por 18 horas a temperatura de 4 °C. Após o período de incubação as lâminas foram lavadas com solução salina (PBS) e incubadas com anticorpo secundário, terciário e revelados com cromógeno DAB conforme as instruções do *kit Starr Trek Universal HRP Detection (Medical Biocare)*.

A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 40 segundos e a montagem das lâminas em resina *Erv-mount* (Erviagas). Todas as imunorreações foram acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado e um controle negativo (sem anticorpo primário). Ao final do procedimento, a expressão proteica foi quantificada pela técnica de densitometria óptica, com auxílio do microscópio óptico e do analisador de imagens (*software IMAGE J*).

Essas reações foram realizadas conforme os procedimentos padronizados em nosso laboratório, utilizando-se o complexo avidina/biotina (*NovoStain Super ABC Kit*, Novocastra) e revelação com diaminobenzidina. Os controles negativos foram obtidos omitindo-se o anticorpo primário. Também foram realizadas reações de imunofluorescência com o uso do microscópio *Zeiss Imager M2* (Zeiss, Alemanha) acoplado ao software *AxioVision* (Zeiss, Alemanha).<sup>(103,104)</sup>

Foram analisados os seguintes anticorpos por IHQ nesse estudo e suas respectivas especificações: E-caderina (anticorpo anti-E-caderina, E-caderina 24e10, *Cell Signaling Technology* na concentração 1:200), Vimentina (anticorpo anti-Vimentina, Clone V9, *Dako* na concentração 1:100), VEGF (anticorpo anti-VEGF, VEGF(a-20): sc-152, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* na concentração 1:100) e AKT (anticorpo anti-AKT, *Cell Signaling Technology* na concentração de 1:200).

### 3.7 Análises Estatísticas

A análise individual da expressão gênica dos grupos de pacientes com CM com obesidade ou sem obesidade foi realizada empregando as médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ( $\Delta\Delta Ct$ ), logaritmo de base 10 do  $\Delta\Delta Ct$  e, para isso, comparando com seus respectivos grupos controle e adotando o programa PRISMA para avaliação.

A comparação entre a expressão gênica – para cada gene analisado (*CHD1*, *VIM*, *IL17B* e *IL8*) – entre os grupos com obesidade e sem obesidade (grupo 1 e 3 e os seus respectivos grupos controle), teve a sua análise estatística descritiva realizada a partir dos cálculos das medidas de tendência central e dispersão e contagens de frequência.

Para a análise estatística inferencial das variáveis quantitativas foi utilizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação da normalidade dos dados. Em seguida foi aplicado o Teste t com correlação de Welch.

Para as análises estatísticas dos dados da IHQ entre os dois grupos de mulheres com CM (grupo 1a e grupo 3a) nos quatro anticorpos analisados (E-caderina, Vimentina, VEGF e AKT) foram obtidos 20 pontos por densidade óptica calculada pelo *software* IMAGE J de três diferentes imagens selecionadas de cada paciente e, após isso, obtida a média de cada imagem. Com a média destas três imagens de cada anticorpo, estes dados foram analisados no programa PRISMA.

Em todas as análises foi considerado estatisticamente significativo p valor  $< 0,05$ . Os programas utilizados foram o SPSS (IMB, versão 23, 2014), PRISMA (versão 6.10, 2015) e GraphPad InStat (3.10, 2009).

## 4. Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados da Expressão Gênica

As pacientes que foram submetidas à análise da expressão gênica foram divididas em quatro grupos de acordo com o anatomopatológico (carcinoma ductal invasivo ou benigno) e pelo IMC (com obesidade e sem obesidade) (Quadro 2).

Quadro 2: Perfil clínico entre os grupos analisados para a expressão gênica

|                                            | Grupo 1<br>(Com CM<br>com<br>Obesidade) | Grupo 2<br>(Controle<br>com<br>Obesidade) | Grupo 3<br>(Com CM<br>sem<br>Obesidade) | Grupo 4<br>(Controle<br>sem<br>Obesidade) |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Número de participantes                    | 8                                       | 3                                         | 9                                       | 4                                         |
| Média de idade $\pm$ DP (anos)             | 53,0 $\pm$ 17,0                         | 45,0 $\pm$ 11,5                           | 56,0 $\pm$ 13,7                         | 42,5 $\pm$ 10,6                           |
| Média do IMC $\pm$ DP (kg/m <sup>2</sup> ) | 32,7 $\pm$ 2,5                          | 33,7 $\pm$ 3,0                            | 25,0 $\pm$ 2,4                          | 23,3 $\pm$ 1,7                            |
| Etnia                                      | Branças (4)<br>Pardas (3)<br>Negras (1) | Branças (2)<br>Pardas (1)<br>Negras (0)   | Branca (6)<br>Pardas (2)<br>Negras (1)  | Branças (2)<br>Pardas (1)<br>Negras (1)   |

|                                |             |          |             |           |
|--------------------------------|-------------|----------|-------------|-----------|
| Diagnóstico do CM na menopausa | 5/8 (62,5%) | N/A      | 7/9 (77,8%) | N/A       |
| Histórico familiar de CM       | 2/8 (25%)   | 0/3 (0%) | 2/9 (22,2%) | 1/4 (25%) |
| Histórico pessoal de DM2       | 1/8 (12,5%) | 0/3 (0%) | 1/9 (11,1%) | 0/4 (0%)  |
| Em uso de metformina           | 0/8 (0%)    | 0/3 (0%) | 0/9 (0%)    | 0/4 (0%)  |
| Histórico pessoal de HAS       | 6/8 (75%)   | 0/3 (0%) | 3/9 (33,4%) | 0/4 (0%)  |
| Em uso de iECA ou BRA          | 6/8 (75%)   | 0/3 (0%) | 2/9 (22,2%) | 0/4 (0%)  |
| Histórico pessoal de DLP       | 1/8 (12,5%) | 0/3 (0%) | 0/9 (0%)    | 0/4 (0%)  |
| Em uso de Estatinas            | 1/8 (12,5%) | 0/3 (0%) | 0/9 (0%)    | 0/4 (0%)  |

Legenda do quadro: DP (desvio padrão), IMC (índice de massa corpórea), DM2 (diabetes mellitus tipo 2), HAS (hipertensão arterial sistêmica), iECA (inibidores da enzima conversora de angiotensina), BRA (bloqueadores do receptor da angiotensina), CM (câncer de mama), DLP (dislipidemia) e N/A (não se aplica).

Os resultados da expressão gênica dos quatro genes analisados (*CDH1*, *VIM*, *IL17B* e *IL8*) foram realizados da seguinte maneira: inicialmente foi realizada a avaliação entre o valor do *pool* de pacientes do grupo 2 (controle com obesidade) em comparação aos valores individuais de pacientes do grupo 1. Na avaliação do mesmo gene, avaliamos o valor do *pool* de pacientes do grupo 4 (controle sem obesidade) em comparação aos valores individuais de pacientes grupo 3. Além disso, analisamos estatisticamente esses dados em conjunto comparando os grupos com e sem obesidade.

Em alguns casos, a expressão gênica de algumas pacientes não foi possível de interpretação e foram excluídas da análise estatística. Isso ocorreu em uma paciente do grupo 1 no gene *IL17B*, uma paciente do grupo 3 no gene *IL17B* e uma paciente do grupo 3 no gene *IL8*.

Na análise da expressão do gene *CDH1* no grupo de pacientes com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 1 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 2 (controle com obesidade) (Figura 6). Na análise da expressão do gene *CDH1* no grupo de pacientes sem obesidade ( $\text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$ ), também encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 3 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 4 (controle sem obesidade) (Figura 7).

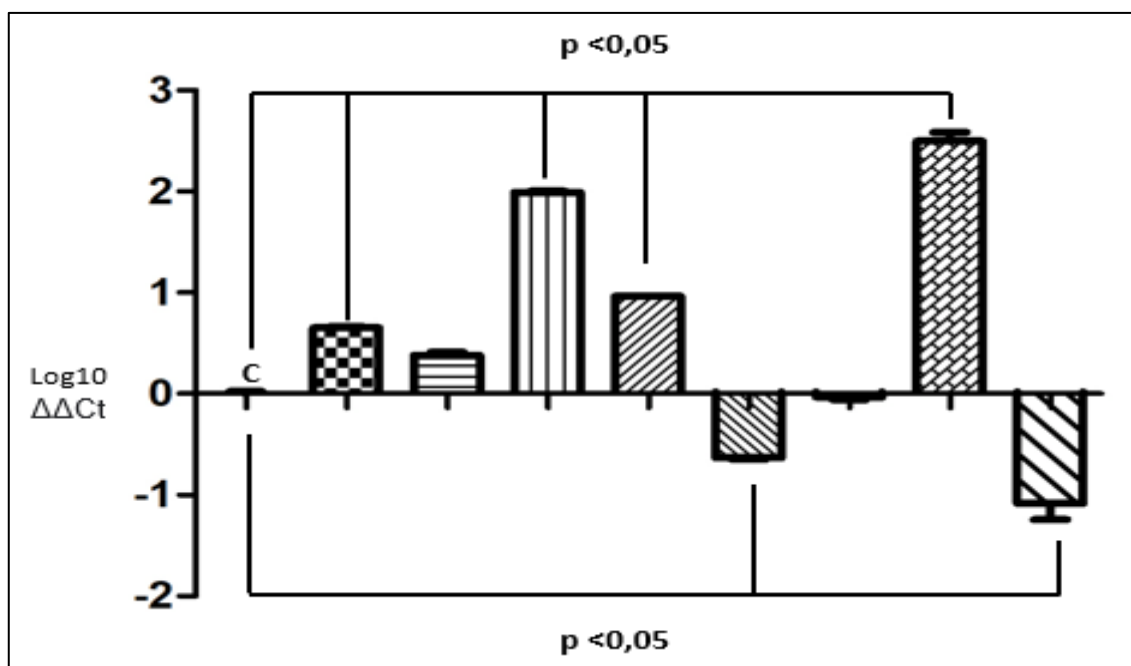


Figura 6: Expressão gênica do *CDH1* nas pacientes com obesidade. Análise individual do gene *CDH1* nas pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) comparando o *pool* do grupo controle (C) e individualmente as oito pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ );  $\text{Log}_{10}$  (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta C_t$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

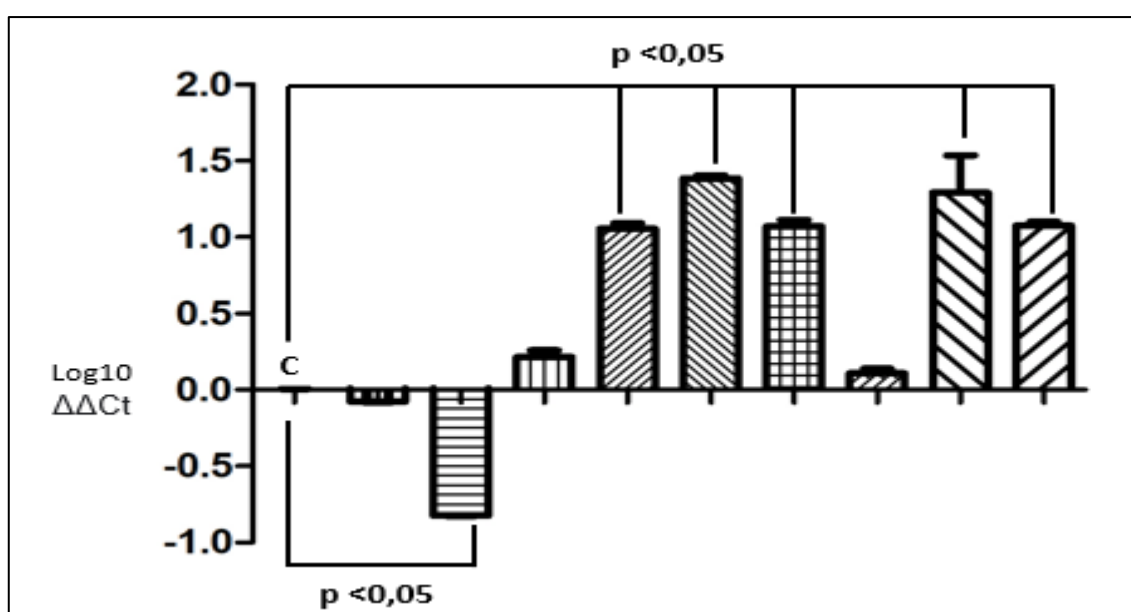


Figura 7: Expressão gênica do *CDH1* nas pacientes sem obesidade. Análise individual do gene *CDH1* nas pacientes com CM e sem obesidade ( $\text{IMC} < 30$

kg/m<sup>2</sup>) comparando o *pool* grupo controle (C) e individualmente as nove pacientes com CM e sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>); Log10 (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta Ct$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

Posteriormente, realizamos a análise estatística entre os dois grupos com CM. Na análise conjunta da expressão do gene *CDH1* não encontramos diferença significativa entre os grupos 1 e 3 (IC 95% de -2,228 a 0,8815, p = 0,3771).

Na análise da expressão do gene *VIM* no grupo de pacientes com obesidade (IMC  $\geq$  30kg/m<sup>2</sup>), encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 1 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 2 (controle com obesidade) (Figura 8). Na análise da expressão do gene *VIM* no grupo de pacientes sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>), também encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 3 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 4 (controle sem obesidade) (Figura 9).

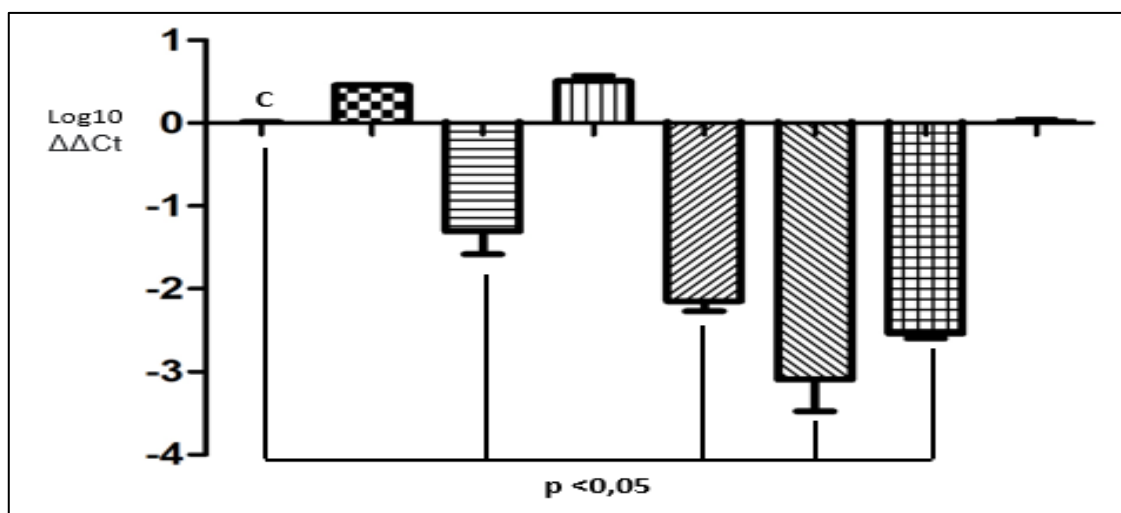


Figura 8: Expressão gênica da *VIM* nas pacientes com obesidade. Análise individual do gene *VIM* nas pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) comparando o *pool* do grupo controle (C) e individualmente as oito pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ );  $\text{Log}_{10}$  (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta C_t$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

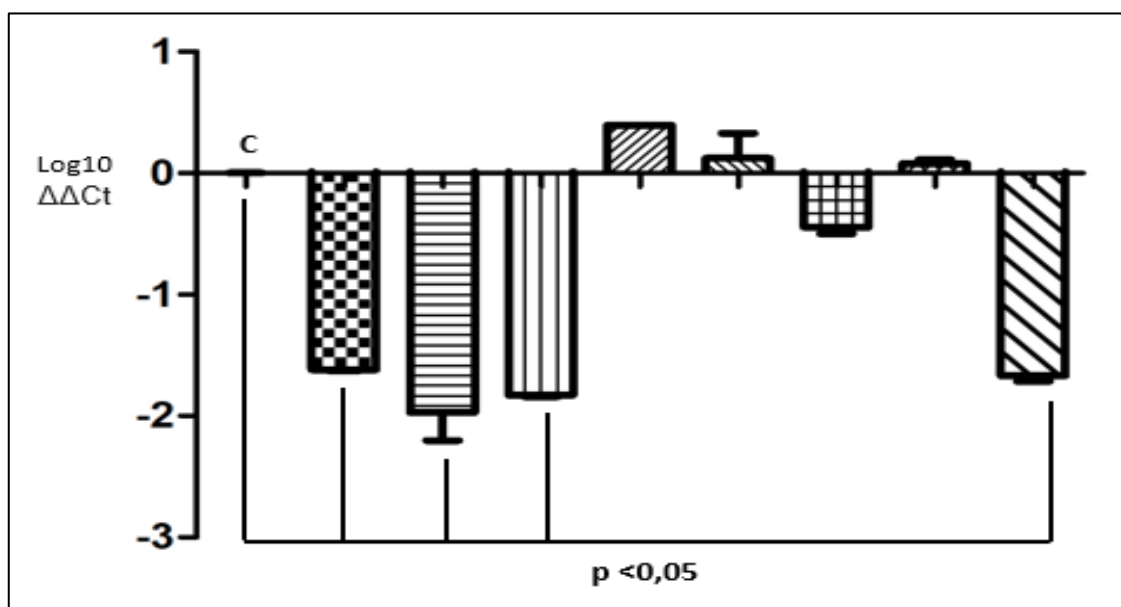


Figura 9: Expressão gênica da *VIM* nas pacientes sem obesidade. Análise individual do gene *VIM* nas pacientes com CM sem obesidade ( $\text{IMC} < 30$

kg/m<sup>2</sup>) comparando o *pool* grupo controle (C) e individualmente as nove pacientes com CM e sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>); Log10 (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta C_t$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

Posteriormente, realizamos a análise estatística entre os dois grupos com CM. Na análise conjunta da expressão do gene *VIM* não encontramos diferença significativa entre os grupos 1 e 3 (IC 95% de -1,460 a 0,9006, p = 0,6266).

Na análise da expressão do gene *IL17B* no grupo de pacientes com obesidade (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>), encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 1 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 2 (controle com obesidade) (Figura 10). Na análise da expressão do gene *IL17B* no grupo de pacientes sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>), também encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 3 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 4 (controle sem obesidade) (Figura 11).

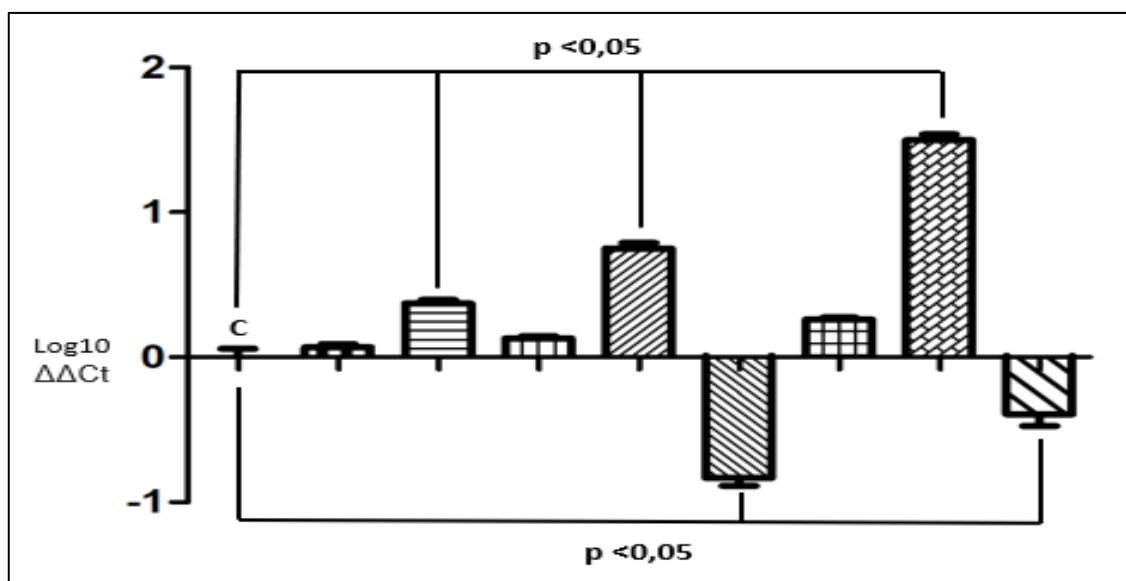


Figura 10: Expressão gênica da *IL17B* nas pacientes com obesidade. Análise individual do gene *IL17B* nas pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) comparando o *pool* do grupo controle (C) e individualmente as sete pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ );  $\text{Log}_{10}$  (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

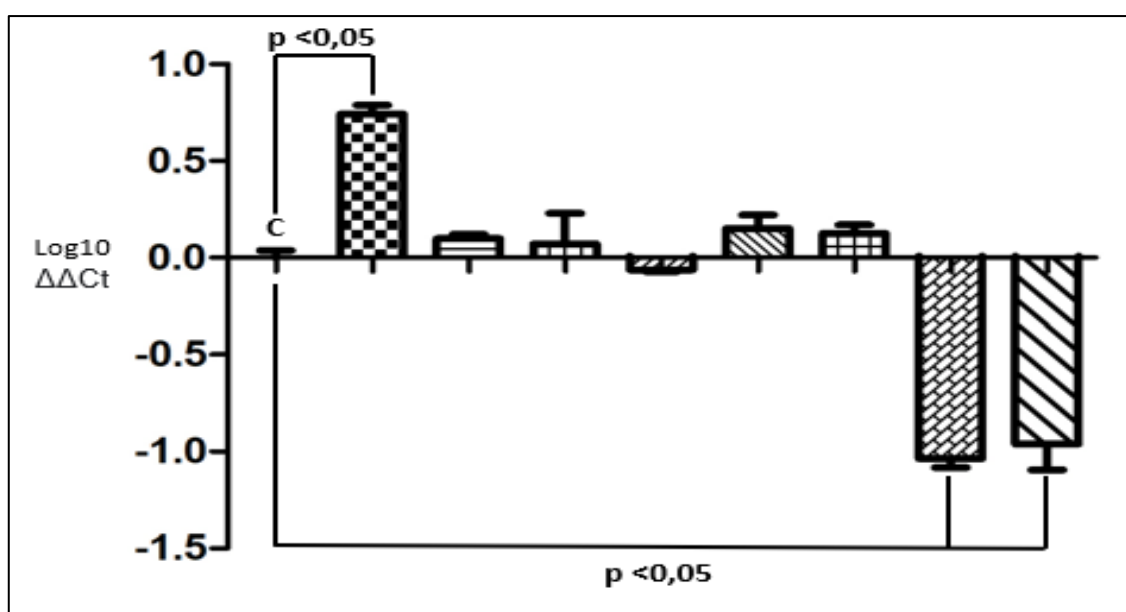


Figura 11: expressão gênica da *IL17B* nas pacientes sem obesidade. Análise individual do gene *IL17B* nas pacientes com CM sem obesidade ( $\text{IMC} < 30$

kg/m<sup>2</sup>) comparando o *pool* grupo controle (C) e individualmente as oito pacientes com CM e sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>); Log10 (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta C_t$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

Posteriormente, realizamos a análise estatística entre os dois grupos com CM. Na análise conjunta da expressão do gene *IL17B* não encontramos diferença significativa entre os grupos 1 e 3 (IC 95% de -2,640 a 5,329, p = 0,5005).

Na análise da expressão do gene *IL8* no grupo de pacientes com obesidade (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>), encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 1 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 2 (controle com obesidade) (Figura 12). Na análise da expressão do gene *IL8* no grupo de pacientes sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>), também encontramos alguns resultados individuais com diferença significativa na comparação das pacientes do grupo 3 ao resultado do *pool* de pacientes do grupo 4 (controle sem obesidade) (Figura 13).

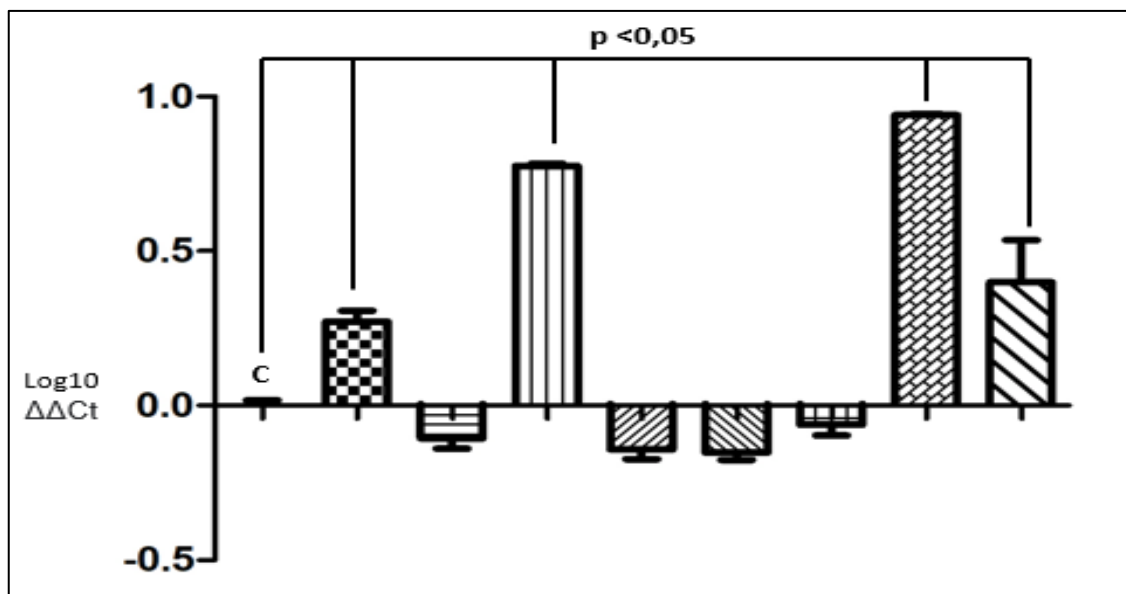


Figura 12: Expressão gênica da *IL8* nas pacientes com obesidade. Análise individual do gene *IL8* nas pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) comparando o *pool* do grupo controle (C) e individualmente as oito pacientes com CM e com obesidade ( $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ );  $\text{Log}_{10}$  (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta C_t$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

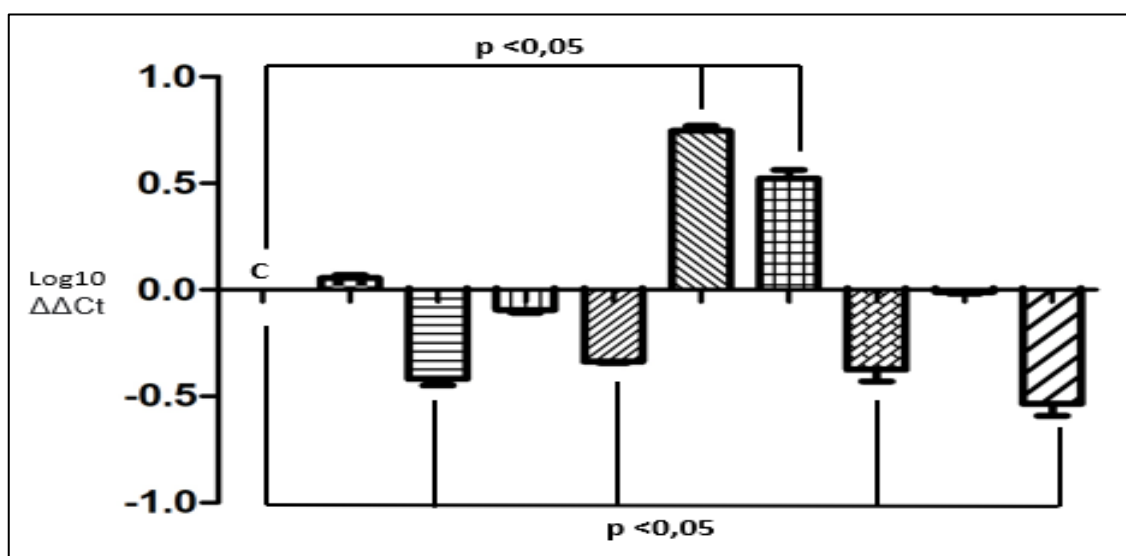


Figura 13: Expressão gênica da *IL8* nas pacientes sem obesidade. Análise individual do gene *IL8* nas pacientes com CM e sem obesidade ( $\text{IMC} < 30$

kg/m<sup>2</sup>) comparando o *pool* grupo controle (C) e individualmente as oito pacientes com CM e sem obesidade (IMC < 30 kg/m<sup>2</sup>); Log10 (logaritmo de base 10) e  $\Delta\Delta C_t$  (médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno).

Posteriormente, realizamos a análise estatística entre os dois grupos com CM. Na análise conjunta da expressão do gene *IL8* não encontramos diferença significativa entre os grupos 1 e 3 (IC 95% de -2,625 a 2,086, p = 0,8195).

#### 4.2 Resultados da Expressão Imuno-Histoquímica das Proteínas

Na avaliação da expressão da IHQ das proteínas, analisamos apenas mulheres com CM, comparando seis pacientes do grupo 1a (com obesidade) e as seis pacientes do grupo 3a (sem obesidade) (Quadro 3)

Quadro 3: Perfil clínico entre os grupos analisados para a expressão proteica

|                                | Grupo 1a<br>(Com CM<br>com<br>Obesidade) | Grupo 3 <sup>a</sup><br>(Com CM<br>sem<br>Obesidade) |
|--------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Número de participantes        | 6                                        | 6                                                    |
| Média de idade $\pm$ DP (anos) | 63,0 $\pm$ 17,7                          | 55,8 $\pm$ 15,2                                      |

|                                            |                                         |                                        |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| Média do IMC $\pm$ DP (kg/m <sup>2</sup> ) | 33,9 $\pm$ 2,5                          | 24,3 $\pm$ 1,9                         |
| Etnia                                      | Branças (3)<br>Pardas (2)<br>Negras (1) | Branca (4)<br>Pardas (1)<br>Negras (1) |
| Diagnóstico do CM na menopausa             | 4/6 (66,6%)                             | 4/6 (66,6%)                            |
| Histórico familiar de CM                   | 2/6 (33,3%)                             | 2/6 (33,3%)                            |
| Histórico pessoal de DM2                   | 1/6 (16,6%)                             | 0/6 (0%)                               |
| Em uso de metformina                       | 0/6 (0%)                                | 0/6 (0%)                               |
| Histórico pessoal de HAS                   | 5/6 (83,3%)                             | 0/6 (0%)                               |
| Em uso de iECA ou BRA                      | 5/6 (83,3%)                             | 0/6 (0%)                               |
| Histórico pessoal de DLP                   | 1/6 (16,6%)                             | 0/6 (0%)                               |
| Em uso de Estatinas                        | 1/6 (16,6)                              | 0/6 (0%)                               |

Legenda do quadro: DP (desvio padrão), IMC (índice de massa corpórea), DM2 (diabetes mellitus tipo 2), HAS (hipertensão arterial sistêmica), iECA (inibidores da enzima conversora de angiotensina), BRA (bloqueadores do receptor da angiotensina), CM (câncer de mama) e DLP (dislipidemia).

Na análise da expressão proteica da E-caderina encontramos uma menor expressão significativa no grupo de mulheres com obesidade (IC 95% de 13,08 a 30,51,  $p < 0,0001$ ) (Figura 14). A E-caderina é expressa preferencialmente na membrana e teve menor expressão entre as pacientes do grupo 1a (Figura 15).

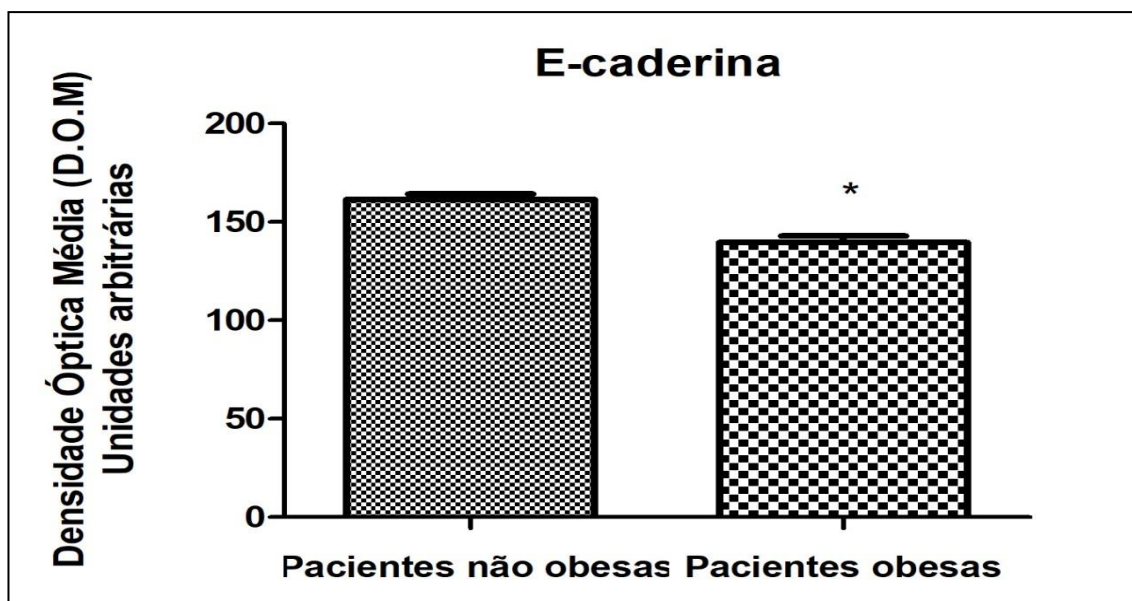


Figura 14: Avaliação quantitativa da expressão proteica da E-caderina. Análise IHQ da expressão proteica da E-caderina por densidade óptica média mostrando uma menor expressão dessa proteína no grupo de pacientes com CM e obesidade em comparação com o grupo de pacientes com CM sem obesidade com diferença significativa entre os grupos (\*  $p < 0,0001$ ).

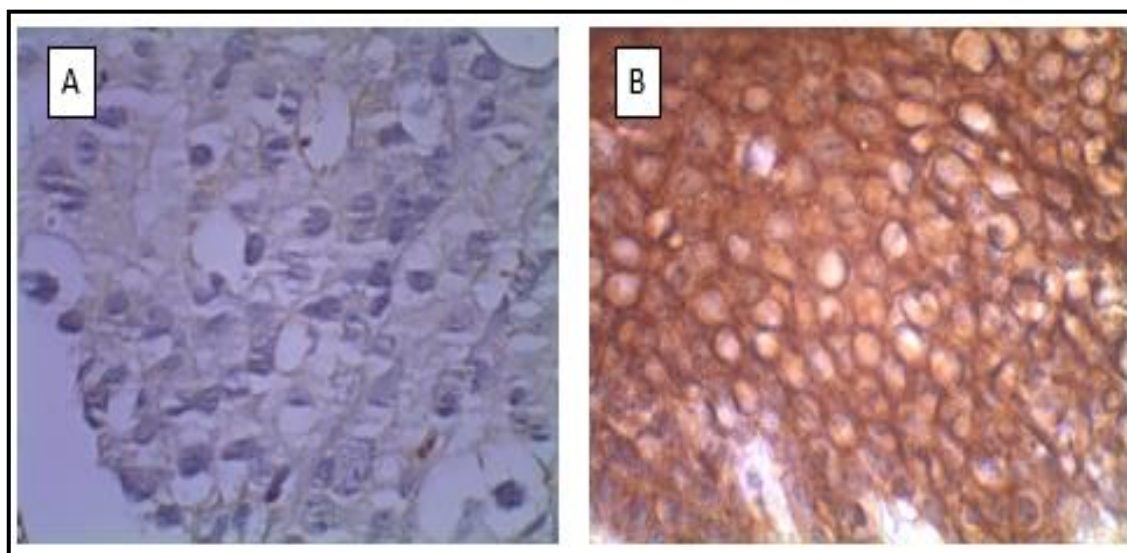


Figura 15: Expressão imuno-histoquímica da E-caderina. Expressão da proteína E-caderina por IHQ em mulheres com CM e obesidade (A) e com CM e sem obesidade (B). A E-caderina teve maior expressão nas mulheres com CM que não tinham IMC de obesidade.

Na análise da expressão proteica da Vimentina encontramos uma maior expressão significativa no grupo de mulheres com obesidade (IC 95% de -45,46 a -28,40,  $p < 0,0001$ ) (Figura 16). A Vimentina é expressa preferencialmente no citoplasma e também membrana celular e teve maior expressão entre as pacientes do grupo 1a (Figura 17).

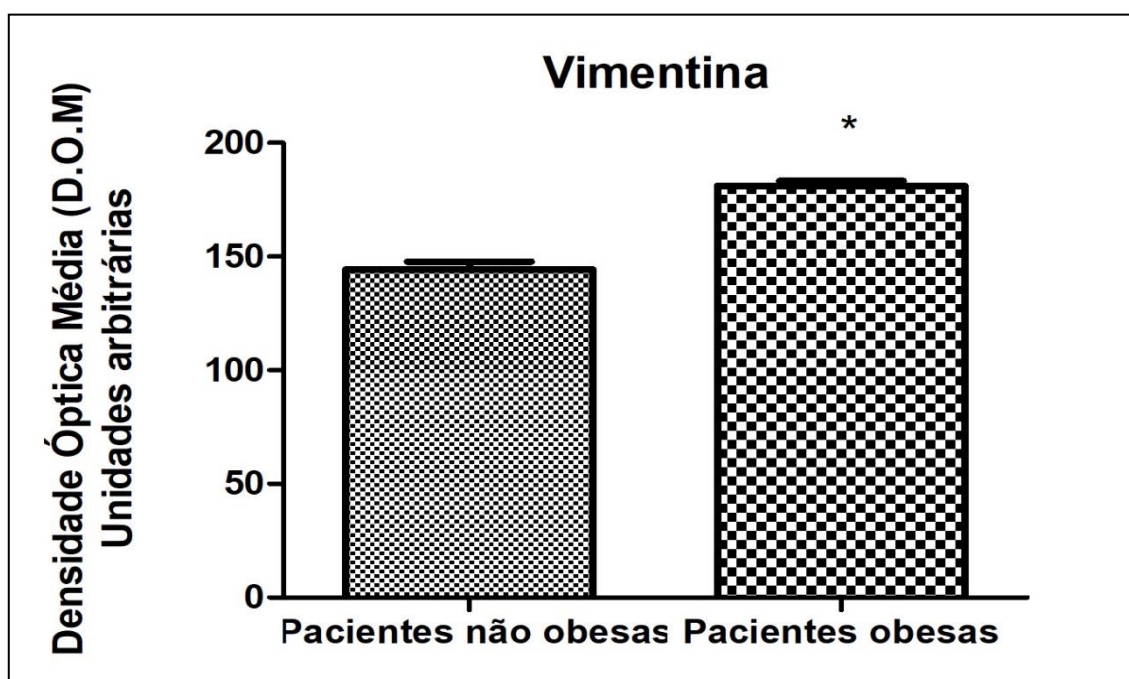


Figura 16: Avaliação quantitativa expressão proteica da Vimentina. Análise IHQ da expressão proteica da Vimentina por densidade óptica média mostrando uma maior expressão dessa proteína no grupo de pacientes com CM e obesidade em comparação com o grupo de pacientes com CM sem obesidade com diferença significativa entre os grupos (\*  $p < 0,0001$ ).

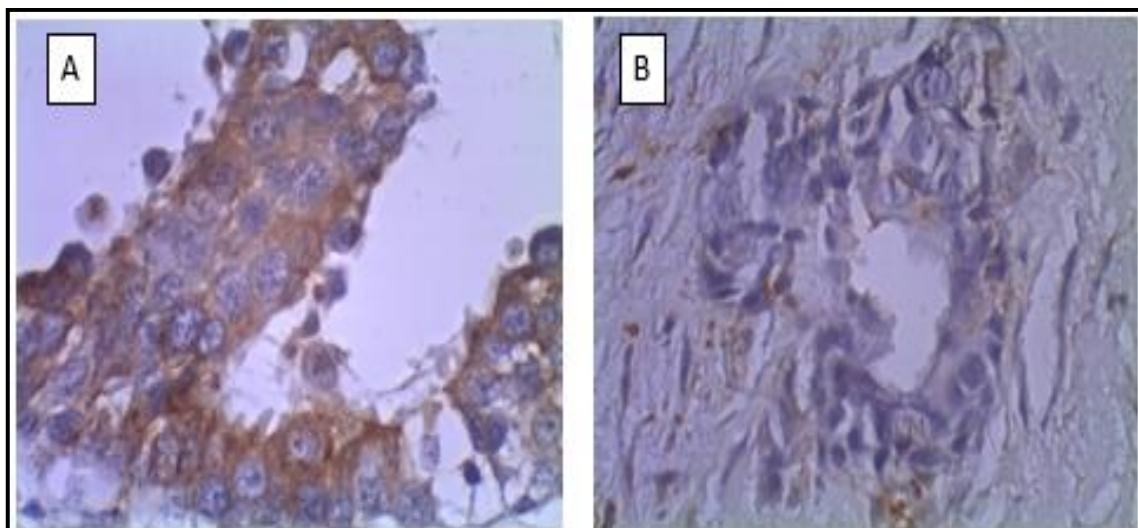


Figura 17: Expressão imuno-histoquímica da Vimentina. Expressão da proteína Vimentina por IHQ em mulheres com CM e obesidade (A) e com CM e sem obesidade (B). A Vimentina apresentou maior expressão nas mulheres com CM e IMC de obesidade.

Na análise da expressão proteica do VEGF encontramos uma maior expressão significativa no grupo de mulheres com obesidade (IC 95% de -45,00 a -27,00,  $p < 0,0001$ ) (Figura 18). O VEGF é expresso preferencialmente na região intracelular (citoplasma) e teve maior expressão entre as pacientes do grupo 1a (Figura 19).

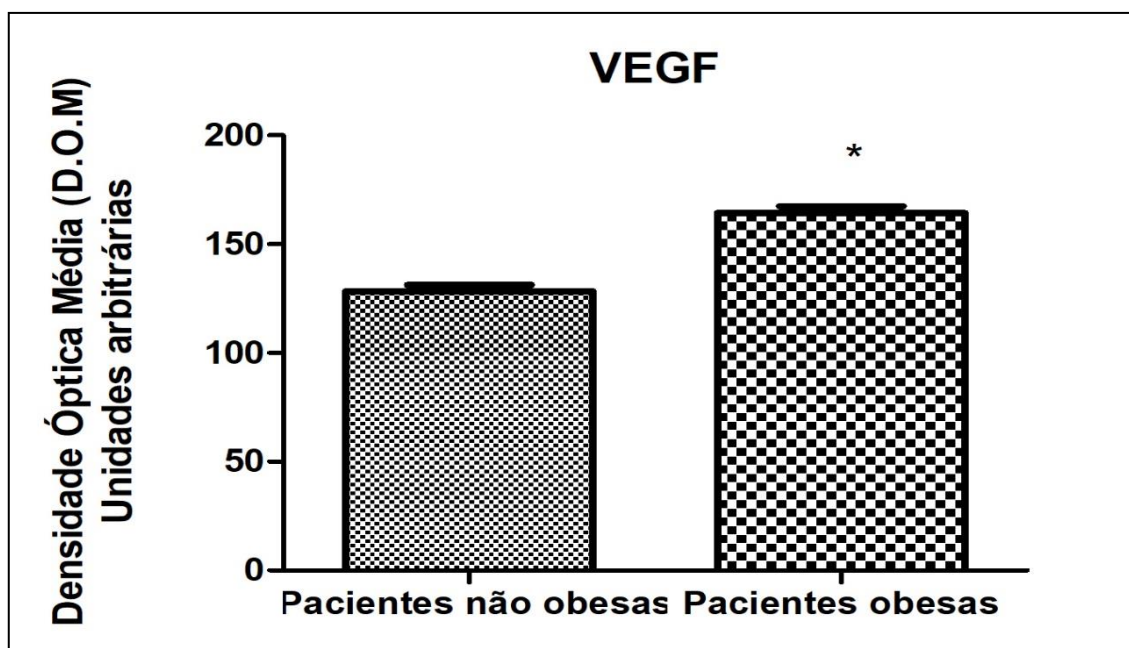


Figura 18: Avaliação quantitativa da expressão proteica do VEGF. Análise IHQ da expressão proteica do VEGF por densidade óptica média mostrando uma maior expressão dessa proteína no grupo de pacientes com CM e obesidade em comparação com o grupo de pacientes com CM sem obesidade com diferença significativa entre os grupos (\*  $p < 0,0001$ ).

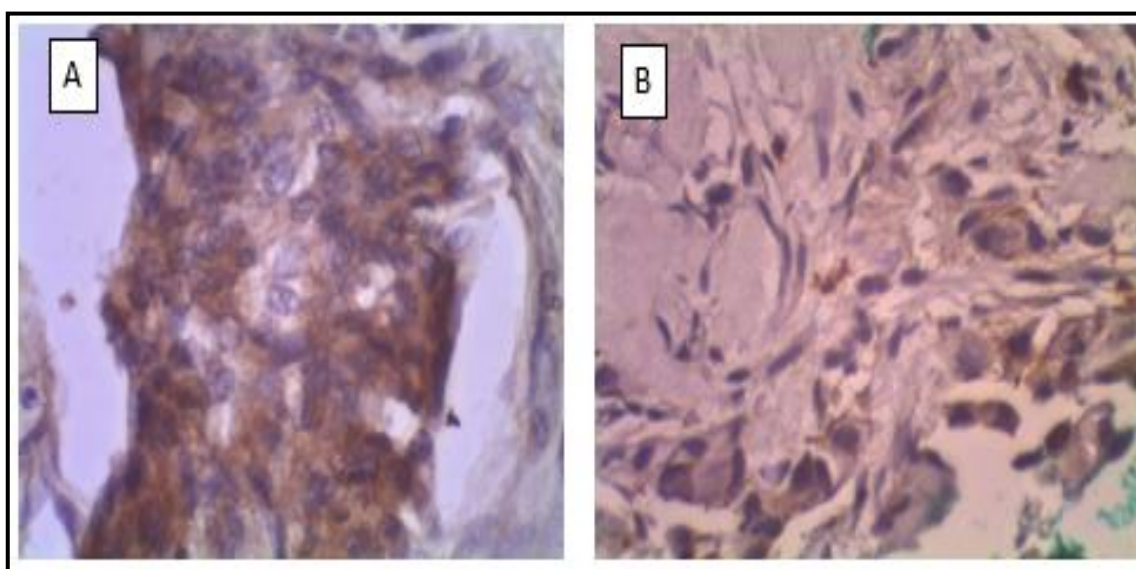


Figura 19: Expressão imuno-histoquímica do VEGF. Expressão da proteína VEGF por IHQ em mulheres com CM e obesidade (A) e com CM e sem obesidade (B). O VEGF apresentou maior expressão nas mulheres com CM e IMC de obesidade.

Na análise da expressão proteica da AKT encontramos uma maior expressão significativa no grupo de mulheres com obesidade (IC 95% de -37,72 a -18,89,  $p < 0,0001$ ) (Figura 20). A AKT é expressa preferencialmente na região intracelular (citoplasma e núcleo) e teve maior expressão entre as pacientes do grupo 1a (Figura 21).

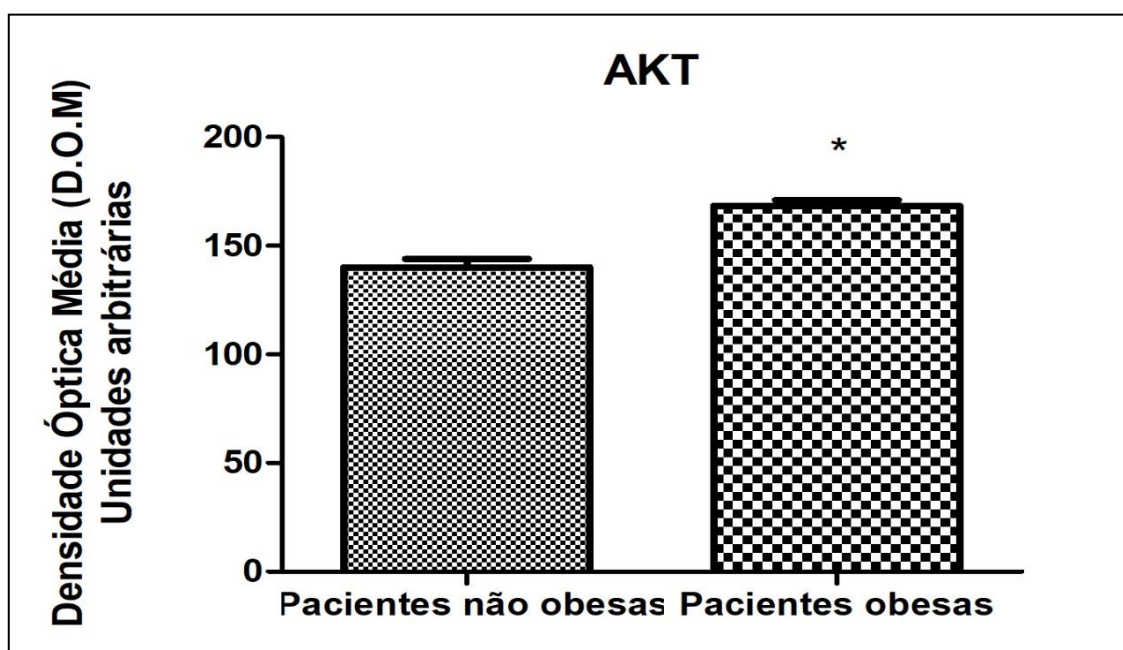


Figura 20: Avaliação quantitativa da expressão proteica da AKT. Análise IHQ da expressão proteica da AKT por densidade óptica média mostrando uma maior expressão dessa proteína no grupo de pacientes com CM e obesidade em comparação com o grupo de pacientes com CM e sem obesidade com diferença significativa entre os grupos (\*  $p < 0,0001$ ).

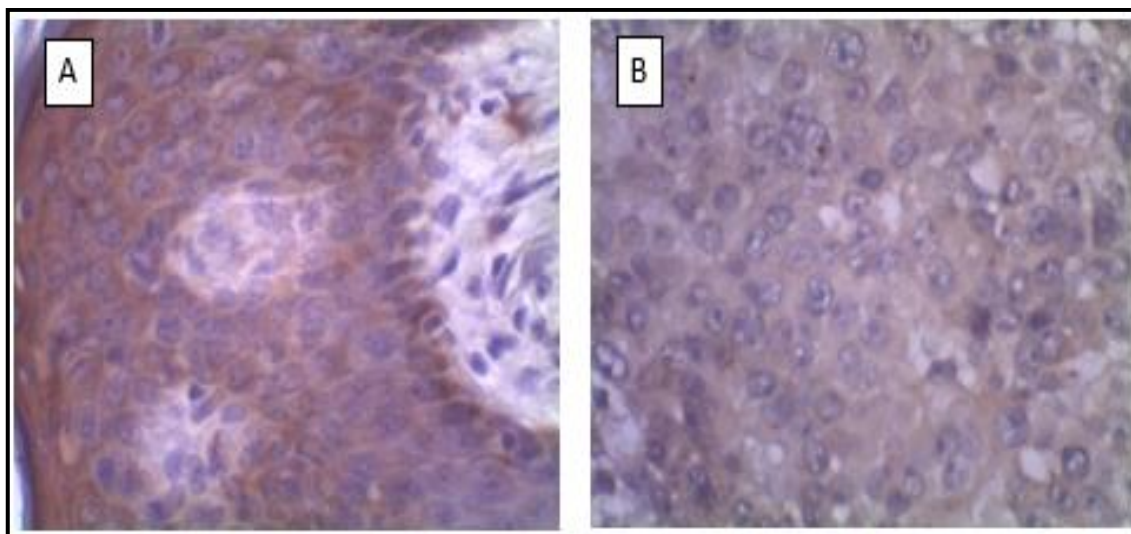


Figura 21: Expressão imuno-histoquímica da AKT. Expressão da proteína AKT por IHQ em mulheres com CM e obesidade (A) e com CM e sem obesidade (B). A AKT apresentou maior expressão nas mulheres com CM e IMC de obesidade.

## **5. Discussão**

## 5.1 DISCUSSÃO

Na nossa análise, realizamos a expressão gênica por RT-PCR de quatro genes (*CDH1*, *VIM*, *IL17B* e *IL8*) e a expressão de quatro proteínas através da IHQ (E-caderina, Vimentina, VEGF e AKT). Durante a seleção dos genes e proteínas candidatos, observamos aumento na expressão desses elementos não apenas em nossos dados de sequenciamento de nova geração NGS e em nossa análise *in silico*, mas também em outras fontes da literatura científica, indicando uma possível correlação entre esses elementos, CM e obesidade.

Na avaliação da expressão das proteínas por IHQ, nossos resultados foram consistentes com a literatura científica.<sup>(66,88,92)</sup> Mulheres com CM e obesidade apresentaram expressão significativamente reduzida da E-caderina em comparação com mulheres afetadas sem obesidade. Além disso, o primeiro grupo também demonstrou expressão significativamente aumentada das proteínas Vimentina, VEGF e AKT. Esses achados estão alinhados com as informações encontradas na literatura científica. A maior expressão das proteínas VEGF e AKT oferece suporte à hipótese de que essas alterações nas vias moleculares e inflamatórias em pacientes com a obesidade podem contribuir para o desenvolvimento do CM e influenciar um prognóstico desfavorável dessa neoplasia.

Na expressão gênica dos quatro genes selecionados para a realização da RT-PCR de pacientes com CM (com e sem obesidade), em comparação com seus respectivos grupos controle, não encontramos diferença significativa quando comparamos essa expressão com seus respectivos grupos de acordo

com o IMC. No entanto, ao analisarmos individualmente algumas mulheres, identificamos diferenças significativa em comparação com o grupo controle como um todo.

Na análise da expressão gênica do *CDH1* apenas duas mulheres do grupo 1 apresentaram uma menor expressão de forma significativa em comparação com o *pool* grupo 2. Já na comparação do grupo das mulheres do grupo 3 a maioria das pacientes desse grupo apresentaram individualmente um aumento significativo da expressão do *CDH1* em comparação com o *pool* do grupo 4. Ao analisarmos individualmente outros fatores que poderiam explicar esses dados, notamos que as duas mulheres do grupo de pacientes do grupo 1 que apresentaram uma expressão significativamente reduzida do gene *CDH1* compartilhavam algumas características. Ambas apresentavam gravidade avançada da lesão, com alto grau da doença e metástase ganglionar, sendo que uma delas veio a óbito. Além disso, ambas foram diagnosticadas no período pós-menopausa. Dentre as mulheres do grupo 3 apenas uma paciente demonstrou uma baixa expressão do gene *CDH1*. Essa paciente apresentava uma lesão de gravidade leve e um IMC indicativo de sobrepeso.

Em uma análise combinada com a expressão do gene *VIM*, observamos que, individualmente, quatro pacientes do grupo 1 apresentaram expressão aumentada desse gene. Por outro lado, um número igual de pacientes do grupo 3 mostrou uma expressão reduzida do gene *VIM*, de forma significativa, em relação aos seu respectivo grupo controle. Ao analisarmos individualmente outros fatores que poderiam explicar esses dados, observamos que as duas mulheres do grupo 1 que apresentaram maior expressão do gene *VIM* tinham

tumores de alto grau e foram diagnosticadas com CM no período pós-menopausa. Por outro lado, no grupo 3, aquelas que apresentaram a redução esperada na expressão do gene *VIM* tinham tumores de baixo grau. Além disso, duas pacientes que apresentaram aumento não esperado na expressão do gene *VIM* compartilhavam o fato de terem lesões de alto grau no exame anatomopatológico.

Na análise individual da expressão gênica das interleucinas estudadas, os resultados obtidos ficaram inconclusivos. Em relação a expressão gênica de *IL17B* observamos expressão significativamente reduzida em quatro pacientes do grupo 1, assim como no mesmo número de pacientes do grupo 3. Esses achados não foram os esperados em relação a alguns resultados descritos na literatura científica.<sup>(74,83)</sup> Ao analisarmos individualmente outros fatores que poderiam explicar esses dados, observamos que a expressão significativamente reduzida da *IL17B* teve em comum a ocorrência em paciente com DLP e diagnóstico do CM no período pós menopausa. Por outro lado, no grupo 3, a redução significativa na expressão da *IL17B* ocorreu apenas em paciente com diagnóstico do CM no período pós-menopausa, sobrepeso e lesões de baixo grau no exame anatomopatológico.

Ao analisarmos individualmente a expressão gênica da *IL8*, observamos uma expressão significativamente maior em três pacientes do grupo 1 enquanto apenas duas pacientes do grupo 3 apresentavam uma redução significativa. Ao investigarmos fatores que poderiam explicar esses resultados, entre as mulheres com CM e obesidade que apresentaram um aumento esperado e significativo da expressão da *IL8*, não identificamos um padrão

claro em relação às suas características. No entanto, duas pacientes desse grupo apresentaram redução não esperada e significativa na expressão desse gene, compartilhando características como tumor de alto grau no exame anatomopatológico (incluindo metástase para linfonodo em uma delas, que acabou vindo a óbito), IMC mais elevado e doenças metabólicas associadas, como HAS e DM2. Por outro lado, no grupo 3, as duas pacientes que apresentaram redução significativa na expressão deste gene, compartilhavam o fato de terem sido diagnosticadas com CM antes da menopausa e terem tumores de baixo grau no exame anatomopatológico. A única paciente deste último grupo que teve um aumento significativo da expressão da *IL8* foi diagnosticada com CM no período pós-menopausa e apresentava um IMC compatível com sobrepeso associado a doenças como HAS e DM2.

Em relação às discrepâncias entre a expressão do gene *CDH1* (que não apresentou diferença significativa ao ser avaliado em todo o grupo de pacientes com e sem CM, juntamente com seus respectivos grupos controle) e a expressão da proteína E-caderina (que demonstrou uma redução significativa entre as pacientes com CM e obesidade) é importante destacar que muitos estudos que exploraram essa relação, comparando pacientes com CM, com e sem obesidade, se basearam na análise da expressão proteica.<sup>(72)</sup>

A obesidade, além de ser um dos grandes problemas de saúde pública da atualidade, também representa um importante fator de risco para o surgimento de outras diversas doenças.<sup>(1,103)</sup> Além das alterações metabólicas relacionadas ao excesso de peso, a obesidade também surge como um

importante fator de risco independente para algumas neoplasias malignas, entre elas o CM.<sup>(4,104)</sup>

As alterações metabólicas e moleculares que aparecem com o ganho de peso não têm um papel fundamental apenas no desenvolvimento do CM, especialmente em mulheres pós-menopausa, mas também tem uma correlação direta com o prognóstico dessa doença. Mulheres com CM e obesidade apresentam maior risco de proliferação e migração celular, crescimento tumoral e resistência a algumas formas de tratamento.<sup>(14,26)</sup>

Por esses motivos, entender as especificidades do CM em pacientes com excesso de peso é de extrema importância. A análise genética e molecular que distingue mulheres com CM com e sem obesidade pode desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de estratégias preventivas mais eficazes e no tratamento personalizado de pacientes com essa condição e com IMC compatível com obesidade.<sup>(14)</sup>

Além do CM, a obesidade também desempenha um papel significativo no aumento do risco para o desenvolvimento de outras doenças. Evidências epidemiológicas indicam um aumento da prevalência mundial de doenças metabólicas (como obesidade, DM2, HAS e DLP), entre os anos de 2000 a 2019. Essas condições representam um fardo substancial em termos de impacto socioeconômico aos países analisados, com altos custos relacionados aos tratamentos dessas doenças e um aumento nas taxas de mortalidade.<sup>(105)</sup>

A obesidade e as outras doenças que compõem a síndrome metabólica têm uma ligação direta com o aumento das doenças cardiovasculares. O acúmulo excessivo do tecido gorduroso está associado a um estado pró-

inflamatório, hipóxia, aumento do recrutamento de células do sistema imunológico, lipotoxicidade e resistência à insulina. Estas alterações também estão correlacionadas com o desenvolvimento do CM.<sup>(14,106)</sup>

As doenças cardiovasculares e o câncer estão entre as principais causas de mortalidade na população em geral. No entanto, a adoção de hábitos de vida mais saudáveis está associada a uma redução nas taxas de mortalidade.<sup>(107)</sup> Uma meta análise de 239 estudos prospectivos em quatro diferentes continentes demonstrou relação direta entre o aumento do IMC e o aumento da mortalidade por todas as causas.<sup>(108)</sup> Com base nessas evidências da literatura científica e nossos resultados, especialmente em relação à expressão de proteínas por IHQ, podemos concluir que as mulheres com CM e obesidade apresentam alterações que sugerem um prognóstico pior, incluindo menor integridade da barreira celular, maior angiogênese, crescimento tumoral e invasão celular.<sup>(14,54)</sup>

Além de ser fundamental no tratamento do excesso de peso, a adoção de mudanças no estilo de vida pode desempenhar papel importante na redução do risco de desenvolvimento de neoplasias relacionadas à obesidade. Estudos têm demonstrado que essas mudanças de hábitos estão relacionadas à prevenção do surgimento de tumores em mulheres no período pós-menopausa, como o CM. Essas mudanças incluem a adoção de um estilo de vida mais saudável, melhores hábitos alimentares, prática regular de exercício físico e, como consequência, perda de peso.<sup>(35)</sup>

Quando analisamos os marcadores moleculares em relação ao ganho de peso, ocorre redução da adiponectina, ao contrário da maioria das

adipocitocinas que aumentam. Por outro lado, a perda de peso está associada ao aumento significativo da adiponectina.<sup>(109,110)</sup> A adiponectina desempenha papel importante na regulação do metabolismo e oferece proteção contra doenças como DM2 e doenças ateroscleróticas.<sup>(111)</sup>

Estudos *in vitro* demonstraram que o uso da adiponectina em linhagens de células de CM resultou em menor migração celular, redução do crescimento tumoral, diminuição da secreção do VEGF e menor potencial invasivo.<sup>(112)</sup> Estudos de meta-análise *in vivo* revelaram associação significativa entre baixos níveis de adiponectina e o risco de CM, mas os dados são inconclusivos em relação ao status pré ou pós-menopausa e à etnia das pacientes.<sup>(113,114)</sup> Com base nessas informações, o aumento da adiponectina parece ter potencial terapêutico significativo na prevenção do CM.

Aproximadamente 35% dos casos de câncer são estimados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo relacionados a fatores de risco modificáveis como dieta, atividade física e peso corporal<sup>(115)</sup> No que diz respeito às mudanças de hábitos alimentares, um estudo prospectivo multicêntrico recente realizado na Europa investigou a relação entre o consumo de determinados alimentos e o risco do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer. Este estudo envolveu mais de 450 mil participantes, com 70,8% deles sendo do sexo feminino. Os participantes deste estudo foram recrutados entre 1991 e 2001 e acompanhados até o presente momento. Estes receberam orientações para substituir 10% do consumo de alimentos processados por alimentos minimamente processados. Após uma análise multivariada ajustada para gênero, tabagismo, nível de escolaridade, atividade física, altura e

histórico de diabetes, os pesquisadores encontraram redução significativa no risco do desenvolvimento de algumas neoplasias, incluindo o CM em mulheres pós-menopausa.<sup>(116)</sup>

Outra análise, baseada no padrão alimentar e o risco de CM, foi conduzida em mulheres participantes do estudo WHI (*Women's Health Initiative*), um estudo observacional com 61.335 mulheres pós-menopausa. Essa análise, demonstrou que uma alimentação com baixo teor de gordura e discreta redução do peso (5% de redução do peso corporal), ao longo de três anos de acompanhamento resultaram em diminuição significativa da incidência do CM e também do risco de mortalidade após o diagnóstico da doença.<sup>(117)</sup>

Dietas hipocalóricas que contém quantidades reduzidas de carboidratos e gorduras, têm sido associadas a melhora do perfil hormonal incluindo redução nos níveis de insulina, leptina, IGF-I, bem como inibição da sinalização pela via AKT/mTOR. Por essas razões, essas dietas podem ter um impacto positivo em pacientes com obesidade e CM.<sup>(38)</sup>

No que diz respeito à atividade física e ao risco reduzido de CM, os resultados são inconclusivos. De maneira geral, uma revisão da literatura demonstrou que o exercício físico, avaliado pelo consumo de oxigênio, desempenha um importante papel na prevenção e progressão de diferentes tipos de neoplasias, além de contribuir para melhor qualidade de vida.<sup>(118)</sup> Em relação à intensidade do exercício físico em mulheres após o diagnóstico do CM, uma meta-análise mostrou que a prática de atividade física recreativa intensa teve um impacto significativo na redução da mortalidade por todas as causas, mortalidade por doenças cardiovasculares e na taxa de mortalidade

relacionada a progressão do CM. Nessa análise, o IMC não foi levado em consideração.<sup>(119)</sup>

Por outro lado, uma revisão sistemática envolvendo 29 estudos (18 estudos de coorte e 11 de casos-controle), que agruparam as pacientes de acordo com o IMC para analisar o risco de desenvolvimento do CM, mostrou que apenas as mulheres dos grupos com peso normal e sobrepeso tiveram uma redução significativa no risco de desenvolvimento da doença, enquanto as mulheres com IMC indicativo de obesidade não apresentaram essa redução.<sup>(120)</sup>

A cirurgia bariátrica é o tratamento mais eficaz para redução de peso corporal em pacientes com obesidade. No entanto, este procedimento cirúrgico é indicado apenas para pacientes com obesidade grau III (obesidade mórbida) ou obesidade grau II com comorbidades que possam melhorar com a perda de peso.<sup>(121)</sup> Uma análise geral do papel da cirurgia bariátrica no tratamento da obesidade em relação a diferentes tipos de câncer mostrou, em um estudo de revisão sistemática e meta-análise, uma redução significativa da incidência de todos os cânceres avaliados, incluindo aqueles diretamente relacionados com a obesidade.<sup>(122)</sup>

Uma nova revisão sistemática e meta-análise foi realizada para avaliar o risco de CM em mulheres submetidas à cirurgia bariátrica. Neste estudo foram avaliados 11 estudos com mais de um milhão de pacientes e, os resultados indicaram redução significativa da incidência do CM nessas mulheres em comparação com o grupo de controle composto de mulheres com obesidade e com faixa de IMC similar antes do procedimento.<sup>(123)</sup> A perda de peso

resultante da cirurgia bariátrica reduz a resistência à insulina, diminui vias moleculares inflamatórias relacionadas à carcinogênese e pode trazer benefícios potenciais ao reduzir a ação da aromatase e também a expressão de ER- $\alpha$ .<sup>(14,124)</sup> Em uma análise retrospectiva que comparou 2.430 mulheres com obesidade submetidas à cirurgia bariátrica entre 1985 e 2015 com outras 20.430 mulheres com obesidade que não realizaram o procedimento cirúrgico durante o mesmo período, observou-se um aumento na incidência do CM entre as mulheres que não foram submetidas a cirurgia bariátrica. Além disso, estas pacientes apresentavam uma prevalência significativa de tumores com RE-positivo.<sup>(125)</sup>

No entanto, a cirurgia bariátrica é restrita a casos mais graves de obesidade. Por essa razão, outra maneira eficaz de auxiliar na perda de peso é por meio do tratamento medicamentoso da obesidade. No Brasil, atualmente, temos medicações aprovadas para este fim, como o orlistate, sibutramina, a combinação de bupropiona com naltrexona e análogos do GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*), como liraglutida e semaglutida.<sup>(103,126)</sup>

Em relação a esses medicamentos que possuem diferentes mecanismos de ação, eficácia, segurança e efeitos colaterais, não existem estudos científicos que comprovem sua eficiência na redução do risco do CM. Os análogos do GLP-1 são considerados as medicações mais eficazes para redução do peso corporal.<sup>(127)</sup> No entanto, embora existam dados controversos, estudos recentes de farmacovigilância indicaram uma associação entre o uso dessas medicações e uma tendência de aumento de algumas neoplasias, como carcinomas de tireoide.<sup>(128,129)</sup> Os análogos do GLP-1 são uma classe de

medicamentos que possuem alta semelhança com o GLP-1 humano produzido no intestino delgado e não são clivados pela enzima DPP4 (dipeptidil peptidase tipo 4). Os análogos do GLP-1 são os únicos medicamentos para o tratamento da obesidade que foram submetidos a uma meta-análise que demonstrou que seu uso, em particular o uso da liraglutida, não aumentou o risco de incidência de CM.<sup>(130)</sup>

A perda de peso não apenas se apresenta como uma ferramenta na prevenção do CM, mas também tem um grande potencial terapêutico no prognóstico após o diagnóstico dessa doença.<sup>(131,132)</sup> Uma revisão sistemática e meta-análise que investigou adipocitocinas e outras citocinas inflamatórias em mulheres sobreviventes do CM demonstrou um potencial significativo nas taxas de recorrência tumoral.<sup>(133)</sup> Durante o acompanhamento clínico das nossas pacientes, observamos aumento do peso após o diagnóstico e início do tratamento, o que poderia comprometer o prognóstico dessas mulheres.

Mulheres com CM e obesidade apresentam maior risco de mutações no ER- $\alpha$ , além de maior ativação na via de sinalização PIK3/AKT/mTOR e aumento da resistência às terapias endócrinas, como o uso de moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERM) e inibidores da aromatase.<sup>(38)</sup> Devido a todos esses fatores, a orientação e as opções de tratamento para perda de peso devem ser integradas ao acompanhamento dessas pacientes que recebem o diagnóstico de CM.<sup>(134)</sup>

Mulheres com CM que têm sobrepeso ou obesidade frequentemente apresentam taxas mais altas de falha no tratamento com inibidores da aromatase, como anastrozol e letrozol, devido à supressão incompleta dos

níveis de estrona e estradiol, bem como resistência a certas quimioterapias.<sup>(38,135)</sup> Esses fatores ressaltam a importância de compreender melhor as alterações genéticas e as vias moleculares que conectam o CM e a obesidade afim de abrir caminhos para novos tratamentos específicos para pacientes com esse fenótipo.

Devido a esses diferentes fatores, estão sendo realizados estudos sobre o uso de medicamentos neoadjuvantes para pacientes com CM, com foco especial naquelas que também apresentam obesidade. Seguindo o raciocínio de uma maior ativação da via de sinalização da PIK3/AKT/mTOR em pacientes com excesso de peso e CM, um dos medicamentos que poderia ser utilizado nessas situações é o everolimus, um inibidor de mTOR.<sup>(14)</sup> Embora o everolimus tenha sido aprovado para o tratamento do CM metastático com RE-positivo e HER2-negativo, e esteja associado ao aumento na sobrevida<sup>(136)</sup>, seu uso está relacionado a diversos efeitos colaterais como hiperglicemia, diabetes e dislipidemia. Isso pode ser problemático em pacientes que já apresentam fatores de risco para essas condições como o excesso de peso e à insulina.<sup>(137)</sup>

Portanto, em pacientes com esse fenótipo, outras terapias adjuvantes podem ser consideradas. Algumas dessas terapias incluem medicamentos utilizados no tratamento das complicações relacionadas à obesidade, como DM2, HAS e DLP. Esses medicamentos podem proporcionar benefícios relacionados à prevenção do CM e também de um melhor prognóstico da doença.<sup>(18)</sup>

Estudos indicam que altos níveis séricos de gorduras trans, ácidos graxos livres e triglicérides, bem como níveis reduzidos de lipoproteínas de alta

densidade (HDL) estão associados com o CM.<sup>(45,138)</sup> Em estudo *in vitro* observou-se que o aumento de ácidos graxos livres ativa ER- $\alpha$  e a via da mTOR que pode estar correlacionado com o surgimento e a agressividade do CM.<sup>(139)</sup>

Outros estudos *in vitro* demonstraram maior expressão de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em linhagens de CM, ativação da via de sinalização PIK3/AKT/mTOR, maior captação e síntese de colesterol por células tumorais<sup>(140)</sup> bem como, uma maior expressão do receptor *scavenger* classe B tipo 1 (SR-B1) que aumenta a captação de HDL pelas células tumorais. Essas alterações estão associadas a um comportamento maligno mais agressivo e um pior prognóstico do CM (LI et al., 2016).<sup>(141)</sup>

As estatinas são a classe medicamentosa de escolha para o tratamento da DLP; uma vez que inibem a enzima HMG-CoA redutase (ou 3-hidroxi 3-metil-glutaril-CoA redutase) e reduzem os níveis de LDL (ADHYARU, JACOBSON, 2018).<sup>(142)</sup> Meta-análises demonstram que o uso de estatina pode ter um efeito protetor contra o CM tanto na prevenção,<sup>(143)</sup> como na evolução após o diagnóstico da doença reduzindo as taxas de recorrência e de mortalidade.<sup>(144-146)</sup> Um estudo de meta-análise também evidenciou este mesmo benefício, porém com respostas variadas de acordo com o fenótipo baseado na expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais desses tumores.<sup>(147)</sup>

Dentre as nossas pacientes, observamos que no grupo 1 (n = 8), apenas uma delas tinha o diagnóstico de DLP e fazia uso de estatina. No entanto, no grupo 3 (n = 9), nenhuma paciente apresentava essa comorbidade e/ou fazia

uso desse tipo de medicamento. Devido ao tamanho reduzido das amostras, não foi possível realizar uma análise estatística para avaliar essa associação.

Foi observada associação significativa entre a HAS e o CM, sendo que a HAS faz parte da síndrome metabólica. Uma meta-análise composta por 30 estudos, totalizando 11.643 casos de pacientes com CM, revelou um aumento no risco relativo dessa associação. Esse aumento do risco foi particularmente relevante em mulheres pós-menopausa. No entanto, não foram encontradas correlações significativas entre HAS e o CM em mulheres pré-menopausa, nem na população de origem asiática. Esses resultados indicam que a associação entre HAS e CM pode variar de acordo com o estágio hormonal e a etnia das pacientes.<sup>(148)</sup>

Existe uma possível relação entre o aumento da pressão arterial e a ativação do sistema renina-angiotensina, que também parece estar envolvido na ligação entre obesidade e CM.<sup>(38)</sup> Entre as adipocitocinas que sofrem alterações em pacientes com obesidade, observa-se aumento significativo na secreção de angiotensina pelos adipócitos, o que resulta no aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e na ativação de vias inflamatórias, como a via NF- $\kappa$ B.<sup>(149)</sup>

O tratamento da HAS é complexo, envolvendo diversas classes de medicamentos com mecanismos de ação distintos. No que diz respeito ao controle da pressão arterial com perfil metabólico favorável, medicamentos que bloqueiam o sistema renina-angiotensina se destacam como excelentes opções no tratamento da HAS, como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e os bloqueadores de receptores de angiotensina (BRA).

Essas classes de medicamentos atuam de forma eficaz no controle da pressão arterial e tem sido amplamente utilizada devido aos seus benefícios adicionais, como a proteção cardiovascular e a melhora do perfil metabólico. Uma meta-análise composta por sete estudos retrospectivos, envolvendo um total de 2.436 pacientes oncológicos, demonstrou que aqueles que estavam utilizando bloqueadores do sistema renina-angiotensina em conjunto com quimioterápicos apresentaram redução significativa nas taxas de mortalidade e um risco reduzido de progressão da doença.<sup>(150)</sup>

Além disso, análises indicam possíveis benefícios nas taxas de sobrevivência em mulheres com CM e HAS que fazem uso de betabloqueadores, outra classe medicamentosa utilizada no tratamento da HAS.<sup>(151-153)</sup> Vale ressaltar que os bloqueadores do canal de cálcio também são amplamente utilizados no tratamento da HAS. Embora os resultados não sejam conclusivos, o uso prolongado dessa classe medicamentosa parece estar associado com um maior risco de desenvolvimento do CM.<sup>(154-156)</sup> Estudos recentes têm mostrado uma associação entre o uso dessa medicação e o aumento das concentrações de VEGF em células humanas, bem como em seus níveis séricos.<sup>(157)</sup>

Em nossa pesquisa, a HAS foi a doença metabólica mais prevalente entre as mulheres com CM. No grupo 1, a HAS estava presente em 75% dos casos. Já no grupo 3, a HAS estava presente em 22,2% dos casos. Em relação ao uso de medicamentos como iECAs ou BRAs, todas as pacientes com HAS no grupo 1 utilizavam algum medicamento que inibia o sistema renina-

angiotensina-aldosterona. No grupo 3, três das nove pacientes apresentavam HAS e apenas uma delas fazia uso de um medicamento desta classe.

O DM2, especialmente, quando associado à obesidade, é uma das doenças da síndrome metabólica que possui uma forte relação com a incidência e o prognóstico do CM.<sup>(158,159)</sup> Uma análise recente de estudos randomizados que avaliaram o risco geral de câncer em pacientes com DM2, envolvendo 12.841 participantes, os pesquisadores constataram que intervenções por meio de dieta e atividade física não resultaram em redução desse risco nessa população.<sup>(160)</sup> porém o estudo recebeu críticas devido ao curto período de intervenção.<sup>(161)</sup>

Os estudos com tratamento medicamentoso do DM2 têm apresentado resultados positivos, especialmente, quando associados ao uso da metformina no contexto do CM. A metformina é a medicação de escolha para iniciar o tratamento medicamentoso do DM2, pois atua reduzindo a resistência à insulina e possui mecanismos de ação que ainda não estão completamente esclarecidos.<sup>(162-164)</sup> No entanto, sabe-se que a metformina desempenha um papel importante na ativação da AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato) o que, por sua vez, inibe a via de sinalização da mTOR. Dessa forma, a metformina se destaca como uma medicação com grande potencial antitumoral, especialmente em neoplasias relacionadas à obesidade e resistência à insulina, como o CM.<sup>(165-167)</sup>

Um estudo de meta-análise revelou que a metformina reduz a incidência de CM e de outros tipos de tumores.<sup>(168)</sup> Em mulheres com CM e DM2, o uso da metformina foi associado a taxas de sobrevivência mais elevadas.<sup>(169)</sup> Uma

revisão sistemática e meta-análise indicou que mulheres que utilizam metformina apresentam menor risco de metástase, recorrência tumoral e melhor resposta aos tratamentos convencionais para o CM.<sup>(170)</sup>

Apesar de alguns estudos terem apresentado resultados inconclusivos e questionáveis, especialmente em pacientes com CM metastático.<sup>(171-173)</sup> o uso da metformina tem demonstrado impacto metabólico tanto em pacientes com CM, quanto naqueles sem a doença. Estudos indicam que o uso da metformina está associado à redução dos níveis de insulina e leptina.<sup>(174)</sup> e ao aumento da adiponectina.<sup>(162,175,176)</sup> Na nossa análise de casos, observamos que apenas uma paciente do grupo 1 (de um total de oito mulheres) e uma paciente do grupo 3 (de um total de nove mulheres) tinham histórico prévio de DM2; nenhuma delas estava fazendo uso de metformina.

Considerando que a resistência à insulina está diretamente relacionada ao CM, uma outra classe de medicamentos sensibilizadores de insulina utilizada no tratamento do DM2.<sup>(164)</sup> e, que poderia ser utilizada como adjuvante no tratamento do CM em pacientes com obesidade, são os agonistas do PPAR-gama ou glitazonas. No entanto, os resultados encontrados na literatura científica em relação a essa classe de medicamentos são controversos. No caso específico da rosiglitazona, uma análise retrospectiva demonstrou redução do risco do CM, especialmente, quando utilizada em combinação com a metformina.<sup>(177)</sup> Além disso, estudos *in vitro*, com linhagens celulares de CM demonstrou que essa medicação aumentou a expressão do gene do supressor tumoral *PTEN* <sup>(178)</sup> e também poderia apresentar um efeito antiproliferativo e ação apoptótica nessas células.<sup>(179)</sup>

É importante ressaltar que a plasticidade de células tumorais pode levar à resistência a determinados tratamentos e influenciar a progressão do tumor. Estudo realizado em animais mostrou que as células tumorais mamárias podem se diferenciar em adipócitos quando expostas a certos medicamentos, como a rosiglitazona que é um agonista do PPAR- $\gamma$  e sensibilizador da insulina no tecido adiposo.<sup>(180)</sup>

Porém, a rosiglitazona foi retirada do mercado mundial devido ao aumento do risco cardiovascular em pacientes com DM2.<sup>(181,182)</sup> Atualmente, a pioglitazona é o único representante dessa classe de medicamentos disponível, pois além dos benefícios metabólicos, demonstrou segurança cardiovascular e foi descartada a associação do seu uso com certos tipos de câncer, como o câncer de bexiga.<sup>(183)</sup>

Em uma análise que investigou a associação entre a pioglitazona e o câncer de bexiga, observou-se uma tendência de aumento do risco para o CM em doses mais altas e com o uso prolongado da pioglitazona. No entanto, é importante ressaltar que esse estudo não teve como objetivo principal avaliar essa associação.<sup>(184)</sup> Em um estudo mais recente, cujo objetivo principal era avaliar potenciais benefícios cardiovasculares da combinação de metformina com a pioglitazona (em doses intermediárias) em comparação com a combinação da metformina e sulfoniluréias (principalmente gliclazida e glimerpirida) em pacientes com DM2; a análise de um dos objetivos secundários não encontrou diferença significativa na ocorrência de câncer de bexiga, CM ou outras neoplasias malignas entre os dois grupos analisados.<sup>(185)</sup>

Em uma análise retrospectiva envolvendo 13.852 mulheres recentemente diagnosticadas com DM2, metade delas utilizavam pioglitazona e a outra metade nunca utilizando essa medicação, não foi encontrada nenhuma correlação entre o uso de pioglitazona e o surgimento do CM, após acompanhamento médio de quase três anos.<sup>(186)</sup>

Em relação ao diagnóstico prévio de DM2 entre nossas pacientes, observamos que apenas uma paciente do grupo 1 (de um total de oito mulheres) e uma paciente do grupo 3 (de um total de nove mulheres) tinham DM2. Nenhuma delas estava fazendo uso de metformina para o tratamento dessa condição, e o um número limitado de casos não permitiu uma avaliação estatisticamente significativa. A paciente com obesidade estava recebendo tratamento com insulina enquanto a paciente sem obesidade estava utilizando uma sulfoniluréia (no caso, a gliclazida).

Ao analisar nossos dados, identificamos possíveis vieses e contrapontos que podem explicar alguns dos resultados encontrados entre as nossas pacientes. Durante a pesquisa, encontramos um número limitado de pacientes, especialmente nos grupos de pacientes com CM, com ou sem obesidade. Vale ressaltar que o período de seleção das participantes ocorreu durante a pandemia de COVID19 e, que resultou em redução significativa no número de procedimentos realizados. Além disso, foi possível incluir apenas as pacientes que apresentavam o diagnóstico anatomopatológico de carcinoma ductal invasivo ou lesões benignas, independentemente do IMC e os grupos foram compostos de mulheres no período pré e pós-menopausa (sendo que a maioria foi diagnosticada no período pós-menopausa).

Outra consideração importante é o método utilizado para classificar a obesidade, que se baseou exclusivamente no IMC para a divisão dos grupos. Na literatura científica, em geral, a maioria dos estudos utiliza o IMC como uma ferramenta importante para associar com outras variáveis estudadas.<sup>(183,187)</sup> Neste estudo em particular, o grupo com obesidade foi definido como IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>, enquanto o grupo sem obesidade foi composto por pacientes com IMC dentro da faixa considerada normal (18,5 a 24,9 Kg/m<sup>2</sup>) e com sobrepeso (25 a 29,9 Kg/m<sup>2</sup>).

Na pesquisa original da qual realizamos a nossa análise *in silico*, na avaliação das 405 amostras de tumores primários de mama, considerando a expressão de diversos genes analisados e as pacientes separadas de acordo com o IMC - peso normal (IMC entre 18,5 a 24,9 Kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso (IMC entre 25,0 a 29,9 Kg/m<sup>2</sup>) e obesidade (IMC  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>) - demonstrou que a obesidade afeta a expressão dos RE e também modula vias relacionadas ao controle do ciclo celular, carcinogênese e proliferação celular. Além disso, indica que medicações que atuam inibindo a via mTOR, podem desempenhar um papel fundamental no tratamento e na melhoria das taxas de sobrevivência em mulheres com obesidade, especialmente as da etnia afro-americana.<sup>(102)</sup>

Quanto à etnia, os resultados da associação entre o CM e características fenotípicas e genotípicas são controversos. Na nossa amostra, a maioria das participantes tinha um perfil caucasóide. É importante ressaltar que a avaliação genética sempre deve ser interpretada com cautela em um país com grande miscigenação étnica, como o Brasil.

Em relação à classificação da obesidade e o seu impacto no CM, os resultados também são inconclusivos. Alguns estudos sugerem que o aumento do risco de incidência do CM é significativamente associado a graus mais elevados de IMC, especialmente em pacientes com obesidade grau II e grau III.<sup>(26,49,188)</sup>

Uma análise que utilizou a medida total de gordura corporal total por meio de absorptometria de raio-X de dupla energia (DEXA) em mulheres pós-menopausa com CM e IMC normal demonstrou que aquelas com maior depósito de adiposidade corporal apresentaram níveis séricos mais elevados de fatores metabólicos e inflamatórios como insulina, leptina e triglicérides. Além disso, essas mulheres apresentaram níveis mais baixos de HDL e um risco significativamente aumentado de desenvolver CM invasivo.<sup>(43)</sup>

Essas informações nos levam a considerar que o IMC pode não ser o parâmetro mais adequado (e também não o único) a ser utilizado na classificação da obesidade em relação ao risco de incidência e prognóstico do CM. Nesse caso, a obesidade poderia ser avaliada através de outros parâmetros clínicos tais como a circunferência abdominal, relação cintura-quadril, circunferência do pescoço e relação cintura-estatura. Além disso, exames para avaliação da gordura corporal como DEXA, bioimpedância, ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética podem ser utilizados.<sup>(126,189,190)</sup>

Um estudo de meta-análise, avaliando a relação entre IMC e todas as causas de mortalidade, encontrou alta taxa de mortalidade em pacientes com obesidade grau II e III. Entretanto, não encontraram as mesmas taxas entre os

indivíduos com obesidade grau I e sobrepeso.<sup>(191)</sup> Por outro lado, outra meta-análise que analisou índices de adiposidade central (como a circunferência abdominal e relação cintura-quadril) obteve uma relação significativamente positiva com altas taxas de mortalidade por todas as causas.<sup>(192)</sup>

Além do IMC, também existem outras classificações menos conhecidas e utilizadas como o Sistema de Estadiamento da Obesidade de Edmonton (EOSS) que leva em consideração não apenas o peso do paciente, mas principalmente a presença de comorbidades, estágio e gravidade dessas doenças associadas.<sup>(193-196)</sup>

Por esse motivo, a avaliação do peso de um indivíduo poder ser mais precisa quando consideramos não apenas a quantidade em quilogramas registrada na balança, mas também a distribuição do tecido gorduroso, o tipo de tecido adiposo e o grau da “adiposopatia”. Isso ocorre porque a distribuição de tecido adiposo pode ter um impacto na atividade da enzima aromatase que está envolvida na conversão de andrógenos em estrógenos e, conseqüentemente, a ativação dos RE nas glândulas mamárias.<sup>(14,37)</sup>

O CM relacionado à obesidade está intimamente ligado com maior atividade da aromatase, especialmente, em mulheres com obesidade no período pós-menopausa. Nesse período, há uma maior expressão da aromatase no tecido adiposo e níveis mais elevados estrógenos em mulheres no período pós-menopausa. Todos esses fatores têm uma correlação epidemiológica significativa com o CM em mulheres com obesidade nesse estágio da vida. O tecido adiposo e os fibroblastos que cercam o tecido epitelial da glândula mamária em mulheres parecem ter uma relação importante com

níveis mais altos de estrógenos localmente e o desenvolvimento do CM, especialmente em mulheres com excesso de peso.<sup>(37,39)</sup>

Sabe-se que ocorre uma importante alteração na quantidade do tecido adiposo e em sua densidade na mama de mulheres no período pós-menopausa, o que poderia contribuir para a carcinogênese do CM. Assim como, o acúmulo de gordura visceral está relacionado às doenças como DM2 e HAS, alguns estudos sugerem que o volume da mama ou grau de inflamação do tecido adiposo branco nessa região, avaliado pela infiltração de macrófagos, também podem ser preditores para o CM.<sup>(197)</sup>

Além da gordura localizada na região mamária, não podemos subestimar o efeito da resistência à insulina e outras vias moleculares que sofrem alterações em pacientes com CM e obesidade, especialmente, aquelas com aumento da gordura visceral.<sup>(14)</sup> Nesse tipo de avaliação, tanto quantitativa quanto qualitativa da obesidade e da distribuição de tecido gorduroso, encontramos alguns paradoxos relacionados à obesidade no contexto do CM. Embora a obesidade seja um fator de risco independente para o surgimento do CM em mulheres pós-menopausa, alguns estudos sugerem que uma relação cintura-quadril aumentada pode ser um fator de risco para a carcinogênese mamária precoce em mulheres no período antes da menopausa.<sup>(198)</sup>

Um estudo adicional investigou o risco de CM pelo grau de inflamação e na atividade da enzima aromatase no tecido adiposo branco de 72 mulheres submetidas à mastectomia. A maioria destas pacientes estavam o período pré-menopausa e todas apresentavam IMC considerado normal (ou seja,  $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$ ). Surpreendentemente, mesmo com um IMC considerado normal,

algumas mulheres apresentavam maior risco de CM associado a um aumento no grau de inflamação desse tecido adiposo, hipertrofia dos adipócitos e maior atividade da aromatase. Esses fatores estavam correlacionados com distúrbios metabólicos, principalmente a presença significativa de DLP.<sup>(199)</sup> Vale ressaltar que, na nossa análise, tínhamos mulheres no período pré e pós-menopausa.

O aumento de 5 kg/m<sup>2</sup> no IMC em mulheres pós-menopausa está associado a um aumento de 12% no risco do CM.<sup>(49)</sup> Por outro lado, meta-análise em mulheres pré-menopausa demonstrou que esse mesmo aumento no IMC resultou em uma redução do risco do desenvolvimento do CM.<sup>(198)</sup> Uma análise multicêntrica com mais de 758.000 mulheres pré-menopausa, com média de idade de 40 anos e acompanhamento médio de quase 10 anos, mostrou que as participantes com os valores mais elevados de IMC apresentaram um menor risco do desenvolvimento de CM. Isso pode ser explicado pela redução na produção de estrógenos ovarianos e pela ocorrência de ciclos anovulatórios em mulheres com obesidade antes da menopausa, especialmente aquelas que têm síndrome dos ovários policísticos.<sup>(18,200)</sup>

Estudos demonstram que a perda de peso está relacionada a uma redução do risco do desenvolvimento do CM e o ganho de peso após o diagnóstico tem uma correlação com um pior prognóstico da doença.<sup>(131,132)</sup> Em relação à perda de peso e a redução da mortalidade em diferentes tipos de câncer, existem outros dados científicos que sustentam um outro paradoxo da obesidade. Em um estudo multicêntrico prospectivo envolvendo 2.071 pacientes idosos, dos quais 16% tinham CM, foi demonstrado que apenas os pacientes com obesidade e idade mais avançada que tiveram uma pequena

perda de peso (< 5%) após o diagnóstico da neoplasia maligna apresentaram redução nas taxas de mortalidade.<sup>(201)</sup>

Apesar dos paradoxos da obesidade que existem em relação a alguns tipos de câncer, incluindo o CM, o tratamento da obesidade e das doenças que fazem parte da síndrome metabólica (DM2, HAS e DLP, juntamente com a obesidade), podem trazer não apenas os benefícios metabólicos esperados, mas também representar uma prevenção e redução das complicações relacionadas ao CM. Um melhor entendimento das alterações genéticas e metabólicas que se interconectam nessa relação entre obesidade e CM pode abrir novas perspectivas para reduzir o risco de desenvolvimento dessa neoplasia e bem como para o uso de novas terapias, como adjuvantes e de precisão, para pacientes que apresentam essas duas condições.

Novas medicações, como inibidores do VEGF (bevacizumabe), inibidores da PI3K (alpelisibe) ou inibidores da AKT (capivasertibe), que estão sendo aprovadas ou ainda estudadas para o tratamento do CM, juntamente com as medicações mencionadas anteriormente para o tratamento do DM2, HAS e DLP, podem desempenhar um papel como terapias adjuvantes de precisão no tratamento de pacientes com obesidade e CM. Devido a obesidade ser uma doença heterogênea e com uma fisiopatologia complexa; estudos futuros que busquem correlacioná-la ao CM devem considerar outros aspectos além do IMC para a classificação e a divisão de grupos a serem comparados.

## **6. Conclusões**

## 6.1 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento do presente estudo podemos concluir que:

- No CM, a redução significativa da expressão proteica por IHQ da E-caderina no grupo de mulheres com obesidade confere padrão mesenquimal com piora da adesão celular e perda da integridade celular em mulheres com IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>;
- O aumento significativo da expressão proteica por IHQ da Vimentina no grupo de mulheres com CM e obesidade confere e reforça padrão mesenquimal com piora da adesão celular e perda da integridade celular em mulheres com IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>;
- No CM, o aumento significativo da expressão proteica por IHQ da VEGF no grupo de mulheres com obesidade confere maior risco de angiogênese e, consequentemente, metástase em mulheres com IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>;
- No CM, o aumento significativo da expressão proteica por IHQ da AKT no grupo de mulheres com obesidade confere maior risco de crescimento tumoral em mulheres com IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>;
- Na avaliação da expressão gênica, por RT-PCR, ao comparar os grupos com CM (com e sem obesidade), não foram encontradas diferenças significativas na expressão dos genes *CDH1*, *VIM*, *IL17B* e *IL8*;
- Embora não tenhamos observado diferenças significativas na avaliação da expressão dos genes analisados, foram encontradas diferenças significativas na expressão das proteínas;

- A avaliação da expressão desses genes, podem ter sofrido a influência de outros fatores (como fatores epigenéticos ou vieses comentados no capítulo anterior).
- Os nossos resultados da expressão proteica de AKT e VEGF demonstram maior ativação da via PIK3/AKT/mTOR em pacientes com obesidade e são pontos cruciais para entender o pior prognóstico do CM em mulheres com IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ;
- O tratamento da obesidade e das suas complicações metabólicas associadas tem que fazer parte da terapia programada para uma paciente com CM e obesidade;
- Medicamentos que tem como foco a inibição da via PIK3/AKT/mTOR e do VEGF podem ser formas de terapia de precisão àquelas pacientes com CM e obesidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steele M, Finucane FM. **Philosophically, is obesity really a disease?** Obes Rev 2023; doi.:10.1111/obr.13590.
2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). **Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 million participants.** Lancet 2016; 387: 1377-1396.
3. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ et al. **Obesity and cardiovascular disease: a scientific statement from American Heart Association.** Circulation 2021; 143(21): e984-e1010.
4. Centers for disease control and prevention. **Obesity and cancer**, 2022. Disponível em: [www.cdc.gov/cancer/obesity/index.htm](http://www.cdc.gov/cancer/obesity/index.htm) <acesso em 08 de abril de 2023>.
5. Lega IC, Lipscombe LL. **Review: Diabetes, obesity, and cancer – pathophysiology and clinical implications.** Endocr Rev 2020; 41(1): bnz014.
6. Kolb R, Sutterwala F, Zhang Q. **Obesity and Cancer: inflammation bridges the two.** Curr Opin Pharmacol 2016; 29: 77-89.
7. King SE, Skinner MK. Epigenetic transgenerational inheritance of obesity susceptibility. Trends Endocrinol Metab 2020; 31(7): 478-494.
8. Grün F. **Obesogens.** Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2010; 17: 453-459.

9. Xu ZY, Jing X, Xiong XD. **Emerging role and mechanisms of the FTO gene in cardiovascular diseases**. *Biomolecules* 2023; 13(5): 850.
10. Pigeyre M, Yasdi FT, Kaur Y, Meyre D. **Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity**. *Clin Sci (London)* 2016; 130(12): 943-986.
11. Heianza Y, Qi L. **Impact of genes and environment on obesity and cardiovascular disease**. *Endocrinology* 2019; 160(1): 81-100.
12. Vecchié A, Dallegri F, Carbone F, Bonaventura A, Liberale L, Portincasa P et al. **Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases**. *Eur J Intern Med* 2018; 48: 6-17.
13. Dikaiou P, Björck L, Adiels M, Lundberg CE, Mandalenakis Z, Manhem K, Rosengren A. **Obesity, overweight and risk of cardiovascular disease and mortality in young women**. *Eur J Prev Cardiol* 2021; 28(12): 1351-1359.
14. Simone VS, D'Avenia M, Argentiero A, Felici C, Rizzo FM, De Pergola G et al. **Obesity and breast cancer: molecular interconnections and potential clinical applications**. *The Oncologist* 2016; 21: 404-417.
15. World Obesity Federation. **World Obesity Atlas 2023**. World Obesity Federation 2023; <https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19> <acessado dia 06 de abril de 2023>.
16. Ministério da Saúde. **VIGITEL Brazil 2019 - surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates and frequency and socialdemographic distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states and the Federal District in 2019**.

17. Ministério da Saúde - INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2021. **Estatística do câncer**. INCA, 2021. Disponível em: [www.inca.gov.br/numeros-de-cancer](http://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer). <acesso em: 28 de junho de 2021>.
18. Wu Y, Li X, Li Q, Cheng C, Zheng L. **Adipose tissue-to-breast cancer crosstalk: comprehensive insights**. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2022; 1877(5): 188800.
19. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. CA Cancer J Clin 2021; 71(3): 209-249.
20. Watkins EJ. **Overview of breast cancer**. JAAPA 2019; 32(10): 13-17.
21. Gao JJ, Swain SM. **Luminal A breast cancer and molecular assays: a review**. Oncologist 2018; 23(5): 556-565.
22. Corso G, Figueiredo J, De Angelis SM, Corso F, Girardi A, Pererira J et al. **E-cadherin deregulation in breast cancer**. J Cell Mol Med 2020; 24(11): 5930-5936.
23. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY et al. **Risk factors and preventions of breast cancer**. Int J Biol Sci 2017; 13(11): 1387-1397.
024. Fakri N, Chad MA, Lahkim M, Houari A, Dehbi H, Belmouden A et al. **Risk factors for breast cancer in women: an update review**. Med Oncol 2022; 39(12): 197.
25. GBD 2019 Risk Factors Collaborators. **Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019**. Lancet 2020; 396: 1223-1249.

26. Ayoub NM, Yaghan RJ, Abdo NM, Matalka II, Akhu-Zaheya LM, Al-Mohtaseb NM. **Impact of obesity on clinicopathologic characteristics and disease prognosis in pre- and postmenopausal breast cancer patients: a retrospective institutional study.** J Obes 2019; 2019: 3820759.
27. Naaman SC, Shen S, Zeytinoglu M, Iyengar NM. **Obesity and breast cancer risk: the oncogenic implications of metabolic dysregulation.** J Clin Endocrinol Metab 2022; 107: 2154-2166.
28. Mukherjee A, Bilecz AJ, Lengyel E. **The adipocyte microenvironment and cancer.** Cancer Metastasis Rev 2022; 41(3): 575-587.
29. Vandeweyer E, Hertens D. **Quantification of glands and fat in breast tissue: an experimental determination.** Ann Anat 2002; 184(2): 181-184.
30. Heinonen S, Jokinen R, Rissanen A, Pietilainen KH. **With the adipose tissue mitochondrial metabolism in health and obesity.** Obes Rev 2020; 21(2): e12958.
31. Taylo EB. **The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity.** Clin Sci (London) 2021; 135(6): 731-752.
32. Picó C, Palou M. **Leptin and metabolic programming.** Nutrients 2021; 14(1): 114.
33. Izquierdo AG, Crujeiras AB, Casanueva FF, Carreira MC. **Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later?** Nutrients 2019; 11(11): 2704.
34. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V. **Role of leptin and inflammation and vice versa.** Int J Mol Sci 2020; 21(16): 5887.

35. Halpern B, Mendes TB. **Obesity, weight loss and gynecologic neoplasms: a narrative review.** Women Health 2022; 62(5): 372-383.
36. Van Kruijsdijk RC, Van der Wall E, Visseren FL. **Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009; 18(10): 2569-2578.
37. Simpson ER, Brown KA. **Obesity and breast cancer: role of inflammation and aromatase.** J Mol Obes 2013; 51: 51-59.
38. Barone I, Caruso A, Gelsomino L, Giordano C, Bonofiglio D, Catalano S et al. **Obesity and endocrine therapy resistance in breast cancer: mechanistic insights and perspectives.** Obes Rev 2022; 23(2): e13358.
39. Stanczyk FZ, Mathews BW, Sherman ME. **Relationships of sex steroids hormone levels in benign and cancerous breast tissue and blood: a critical appraisal of current science.** Steroids 2015. 99(Pt A): 91-102.
40. Yuxin L, Chen L, Xiaoxia L, Yue L, Junjie L, Youzhu L et al. **Research progress on the relationship between obesity-inflammation-aromatase axis and male infertility.** Oxi Med Cell Longev 2021; 8; 2021: 6612796.
41. MS - INCA, 2015. **Diretrizes para detecção precoce do cancer de mama no Brasil. MS/INCA, 2015.** Rio de Janeiro: INCA; 2015.
42. FEBRASGO. **Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Tratado de Ginecologia – FEBRASGO.** 1a. edição. Rio de Janeiro – RJ. GEN Guanabara-Koogan. 5 de outubro de 2018.
43. Iyengar NM, Zhou XK, Mendieta H, El-Hely O, Giri DD, Winston L et al. **Effects of obesity on breast cancer aromatase expression and systematic**

**metabo-inflammation in women with BRCA1 and BRCA2 mutations.** NPJ Breast Cancer 2021; 7(1): 18.

44. Corso G, Figueiredo J, De Angelis SP, Corso F, Girardi A, Pereira J et al. **E-cadherin deregulation in breast cancer.** J Cell Mol Med 2020; 24(11); 5930-5936.

45. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. **Body mass index and risk of 22 specific cancers: a population-based cohort study of 5.24 million UK adults.** Lancet 2014; 384: 755-765.

46. Neuhouwer MD, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL et al. **Overweight, obesity, and postmenopausal invasive breast cancer risk: a secondary analysis of the Women's Health Initiative randomized clinical trials.** JAMA Oncol 2015; 1: 611-621.

47. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ, Friedman ER, Slingerland JM. **Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention.** CA Cancer J Clin 2017; 67: 378-397.

48. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D et al. **Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in The Million Women Study: cohort study.** BMJ 2007; 335: 1134.

49. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. **Body mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies.** Lancet 2008; 371: 569-578.

50. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B et al. **Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective**

**Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC).** Int J Cancer 2004; 111: 762-771.

51. Ahn J, Schatzkin A, Lacey JV, Albanes D, Ballard-Barbash R, Adams KF et al. **Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk.** Arch Intern Med 2007; 167: 2091-2102.

52. Chlebowski RT, Aiello E, McTiernan A. **Weight loss in breast cancer patient management.** J Clin Oncol 2002; 20: 1128-1143.

53. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults.** N Engl J Med 2003; 348: 1625-1638.

54. Chan DS, Vieira AR, Aune D, Bandera EV, Greenwood DC, McTiernan A et al. **Body mass index and survival in women with breast cancer: systematic review and meta-analysis of 82 follow-up studies.** Ann Oncol 2014; 25: 1901-1914.

55. Copson ER, Cultress RI, Maishman T, Eccles BK, Gerty S, Stanton L et al. **Obesity and the outcome of young breast cancer patients in the UK: the POSH study.** Ann Oncol 2015; 26; 101-112.

56. Campbell SC, Wisniewski PJ, Noji M, McGuinness LR, Häggblom MM, Lightfoot SA et al. **The effect of diet and exercise on intestinal integrity and microbial diversity in mice.** PloS One 2016; 11(3): e0150502.

57. Storkson RH, Aamodt R, Vetvik KK, Pietilainen K, Bukholm G, Jonsdottir K et al. **mRNA expression of adipocytokines and glucocorticoid-related genes are associated with downregulation of E-cadherin mRNA in colorectal adenocarcinomas.** Int J Colorectal Dis 2012; 27: 1021-1027.

58. Viedma-Rodríguez R, Martínez-Hernández MG, Martínez-Torres D, Baiza-Gutman LA. **Epithelial mesenchymal transition and progression of breast cancer promoted by diabetes mellitus in mice are associated with increased expression of glycolytic and proteolytic enzymes.** Hormones and Cancer 2020; 11: 170-181.
59. Salilew-Wondim D, Wang Q, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M, Hossain MM et al. **Polycystic ovarian syndrome is accompanied by repression of gene signatures associated with biosynthesis and metabolism of steroids, cholesterol and lipids.** J Ovarian Res 2015; 8:24
60. Schaffler A, Scholmerich J. **Innate immunity and adipose tissue biology.** Trends Immunol 2010; 31: 228-235.
61. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. **Targeting NF- $\kappa$ B pathway for the therapy of diseases: mechanisms and clinical study.** Signal Transduct Target Ther 2020; 5(1): 209.
62. Ma L, Yang R, Gu J, Jiang H, Li H. **The expression of AGGF1, FOXC2, and E-cadherin in esophageal carcinoma and their clinical significance.** Medicine (Baltimore) 2020; 99(37): e22173.
63. Bure IV, Nemtsova MV, Zaletaev DV. **Roles of E-cadherin and noncoding RNAs in the epithelial-mesenchymal transition and progression in gastric cancer.** Int J Mol Sci 2019; 20(12): 2870.
64. Druzhkova I, Ignatova N, Prodanets N, Kiselev N, Zhukov I, Shirmanova M et al. **E-cadherin in colorectal cancer: relation to chemosensitivity.** Clin Colorectal Cancer 2019; 18(1): 74-86.

65. Wang X, Dong B, Zhang K, Ji Z, Cheng C, Zhao H et al. **E-cadherin bridges cell polarity and spindle orientation to ensure prostate epithelial integrity and prevent carcinogenesis in vivo.** PloS Genet 2018; 14(8): e1007609.
66. Christgen M, Bartels S, van Luttikhuisen JL, Bublit J, Rieger LU, Christgen H et al. **E-cadherin to P-cadherin switching in lobular breast cancer with tubular elements.** Mod Pathol 2020; 33(12): 2483-2498.
67. Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. **Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast.** Int J Cancer 2001; 92: 404-408.
68. Huber-Keener KJ. **Cancer genetics and breast cancer.** Best Pract Res Clin Obstet Gynecol 2022; doi:10.1016.
69. Tavakolian S, Goudarzi H, Faghihloo E. E-cadherin, Snail, ZEB-1, DNMT1, DNMT3A and DNMT3B expression in normal and breast cancer tissue. Acta Biochim Pol 2019; 66(4): 409-414.
70. Manfioletti G, Fedele M. **Epithelial-mesenchymal transition (EMT) 2021.** Int J Mol Sci 2022; 23(10): 5848.
71. Kaszak I, Witkowska-Pilasiewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Toka FN, Jurka P. Role of cadherins in cancer – a review. Int J Mol Sci 2020; 21(20): 7624.
72. Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. **Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis.** Oncotarget 2017; 8(10): 16445-16455.

73. Gislette T, Chen J. **The possible role of IL-17 in obesity-associated cancer.** Scientific World Journal 2010; 10:2265-71.
74. Song X, Wei C, Li X. **The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer.** Int Immunopharmacol 2021; 1057544.
75. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM et al. **IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2.** Sci Rep, 2013; 3:3456.
76. Ahmed M, Gaffen SL. **IL-17 inhibits adipogenesis in part via C/EBP $\alpha$ , PPARY and Krüppel-like factors.** Cytokine 2013; 61(3): 898-905.
77. Jayed A, Soltani S, Zargar MS, Khan TA, Shab-Bidar S. **Central fatness and risk of all-cause mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of 72 prospective cohort studies.** BMJ 2020; doi.: 10.1136/bmj.m3324.
78. Feng J, Li L, Ou Z, Li Q, Gong B, Zhao Z et al. **IL-25 stimulates M2 macrophage polarization and thereby promotes mitochondrial respiratory capacity and lipolysis in adipose tissues against obesity.** Cell Mol Immunol 2018; 15(5): 493-505.
79. Li J, Ma L, Zhao Z, Luo S, Gong B, Li J et al. **IL-25-induced shifts in macrophage polarization promote development of beige fat and improve metabolic homeostasis in mice.** PloS Biol 2021; 19(8): e3001348.
80. Cimini FA, Barchetta I, Porzia A, Mainiero F, Costantino C, Bertocchini L et al. **Circulating IL-8 levels are increased in patients with type 2 diabetes and associated with worse inflammatory and cardiometabolic profile.** Acta Diabetol 2017; 54(10): 961-967.

81. Auguet T, Bertan L, Binetti J, Aguilar C, Martínez S, Sabench F et al. **Relationship between IL-8 circulation levels and TLR2 hepatic expression in women with morbid obesity and nonalcoholic steatohepatitis.** *Int J Mol Sci* 2020; 21(11): 4189.
82. Alfaro C, Sanmamed MF, Rodríguez-Ruiz ME, Teijeira A, Oñate C, González A et al. **Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up.** *Cancer Treat Rev* 2017; 60: 24-31.
83. Münch NS, Fang HY, Ingermann J, Maurer HC, Anand A, Kellner V et al. **High-fat diet accelerates carcinogenesis in a mouse model of Barrett's esophagus via interleukin 8 and alterations to the gut microbiome.** *Gastroenterology* 2019; 157(2): 492-506.
84. Bakouny Z, Choueiri TK. **IL-8 and cancer prognosis on immunotherapy.** *Nat Med* 2020; 26(5): 650-651.
85. Ma Y, Ren Y, Dai ZJ, Wu CJ, Ji YH, Xu J. **IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  levels correlate with disease stages in breast cancer patients.** *Adv Clin Exp Med* 2017; 26(3): 421-426.
86. Alraouji NN, Aboussekhra A. **Tocilizumab inhibits IL-8 and the proangiogenic potential of triple negative breast cancer cells.** *Mol Carcinog* 2021; 60(1): 51-59.
87. Alexandar V, Pradeep GN, Murugesan R, Shajahan S, Krishnan J, Ahmed SS. **A systems biology and proteomics-based approach identifies SRC and VEGFA as biomarkers in risk factor mediated coronary heart disease.** *Mol Biosyst* 2016; 12(8): 2594-2604.

88. Zu-Yao Y, Meng-Yang D, Jin-Qiu Y, Shen WX, Zheng DY, Chen JZ et al. **The prognostic value of phosphorylated AKT in breast cancer: a systematic review.** Sci Rep 2015; 5:7758.
89. Bowers LW, Cavazos DA, Maximo IF, Brenner AJ, Husting SD, DeGraffenried LA. **Obesity enhances nongenomic estrogen receptor crosstalk with PI3K/AKT and MAPK pathways to promote in vitro measures of breast cancer progression.** Breast Cancer Res 2013; 15(4): R59
90. Holzbach-Júnior A, Cima BP, Staffen MD, Lindenau JD, Netto-Muniz YC. **A review and meta-analysis on trastuzumab resistance in patients with HER2+ breast cancer.** Mini Rev Med Chem 2023; doi:10.2174.
91. Li X, Dai D, Chen B, Tang H, Xie X, Wei W. **Efficacy of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors for the treatment of advanced solid cancers: a literature-based meta-analysis of 46 randomized controls trials.** PLoS One 2018; 13(2): e0192464.
92. Leung JH, Leung HW, Wang SY, Huang SS, Chan AL. **Efficacy and safety of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR inhibitors as second-line treatment in postmenopausal patients with hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer: a network meta-analysis.** Expert Opin Drug Saf 2021; 20(8): 949-957.
93. Wang S, Liu M, Lian S, Liu N, Zhang G, Zhao Q et al. **Which is the most appropriate PI3K inhibitors for breast cancer patients with or without PIK3CA status mutant? A systematic review and network meta-analysis.** Biomed Res Int 2020; doi:10.115/2020.

94. Turner NC, Oliveira M, Howell SJ, Dalenc F, Cortes J, Gomez-Moreno HL et al. **Capivasertib in hormone receptor-positive advanced breast cancer.** N Engl J Med 2023; 388(22): 2058-2070.
95. Ma J, Hu W, Zhang P, Sun Y, Wang N, Teng X et al. **The association between VEGF+936/T and -634/C polymorphisms and breast cancer susceptibility, tumor growth, and metastasis: evidence from 20.728 subjects.** Cancer Invest 2015; 33(7): 312-317.
96. Kong D, Zhou H, Neelakantan D, Hughes CJ, Hsu JY, Srinivasan RR et al. **VEGF-C mediates tumor growth and metastasis through promoting EMT-epithelial breast cancer cell crosstalk.** Oncogene 2021; 40(5): 964-979.
97. Zhang Z, Luo G, Tang H, Cheng C, Wang P. **Prognostic significance of high VEGF-C expression for patients with breast cancer: an update meta-analysis.** PLoS One 2016; 11(11): e0165725.
98. Santos LV, Cruz MR, Lopes GL, Nogueira-Lima JS. **VEGF-A levels in bevacizumab-treated breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis.** Breast Cancer Res Treat 2015; 151(3): 481-489.
99. Sini V, Cassano A, Corsi D, De Laurentiis M, Gamucci T, Mauri M et al. **Bevacizumab as fist-line treatment in HER2-negative advanced breast cancer: pros and cons.** Tumori 2016; 102(5): 472-480.
100. Lathigara D, Kaushal D, Wilson RB. Molecular mechanisms of Western diet-induced obesity and obesity-related carcinogenesis – a narrative review. Metabolites 2023; 13(5): 675.
101. Colombo J, Moschetta-Pinheiro MG, Novais AA, Stoppe BR, Bonini ED, Gonçalves FM et al. **Liquid biopsy as a diagnostic and prognostic tool for**

**women and female dogs with breast cancer.** *Cancers (Basel)* 2021; 13(20): 5233.

102. Toro AL, Costantino NS, Shriver CD, Ellsworth DL, Ellsworth RE. **Effect of obesity on molecular characteristics of invasive breast tumors: gene expression analysis in a large cohort of female patients.** *BMC Open* 2016; 3:22.

103. Zuccari DA, Leonel C, Castro R, Gelabeti GB, Jardim BV, Moscheta MG et al. **An immunohistochemical study of interleukin-8 (IL-8) in breast cancer.** *Acta Histochem* 2012; 114(6): 571-576.

104. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. **Obesity and cancer risk: emerging biological mechanisms and perspectives.** *Metabolism* 2019; 92: 121-135.

105. Chew NW, Ng CH, Hao-Tan DJ, Kong G, Lin C, Chin YH et al. **The global burden of metabolic disease: data from 2000 to 2019.** *Cell Metab* 2023; 35(3): 414-428.

106. Valenzuela PL, Carrera-Bastos P, Castillo-García A, Lieberman DE, Santos-Lozano A, Lucia A. **Obesity and the risk of cardiometabolic diseases.** *Nat Rev Cardiol* 2023; doi:10.1038.

107. Zhang YB, Pan XF, Chen J, Cao A, Xia L, Zhang Y et al. **Combined lifestyle factors, all-cause mortality and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies.** *J Epidemiol Community Health* 2021; 75(1): 92-99.

108. Global BMI Mortality Collaboration. **Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents.** Lancet 2016; 388(10046): 776-786.
109. Li S, Shim HJ, Ding EL, van Dam RM. **Adiponectin levels and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.** JAMA 2009; 302(2): 179-188.
110. Khalafi M, Sakhaei MH, Kheradmand S, Symonds ME, Rosenkranz SK. **The impact of exercise and dietary interventions on circulating leptin and adiponectin in individuals who are overweight and those with obesity: a systematic review and meta-analysis.** Adv Nutr 2023; 14(1): 128-146.
111. Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q, Hua M. **Adiponectin, TNF- $\alpha$  and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis.** Cytokine 2016; 86: 100-109.
112. Dubois V, Delort L, Billard H, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. **Breast cancer and obesity: in vitro interferences between adipokines and proangiogenic features and/or antitumor therapies?** PLoS One 2013; 8(3): e58541.
113. Ye J, Dong Jia J, Dong S, Zhang C, Yu S, Li L et al. **Circulating adiponectin levels and the risk of breast cancer: a meta-analysis.** Eur J Cancer Prev 2014, 23(3): 158-165.
114. Gu L, Cao C, Fu J et al. **Serum adiponectin in breast cancer: a meta-analysis.** Medicine (Baltimore) 2018; 97(26): e11433.

115. Ansari KK, Jha A. **Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioral and environmental risk factors.** Cureus 2022, 14(9): e28875.
116. Kliemann N, RAuber F, Levy RB, Viallon V, Vamos EP, Cordova R et al. **Food processing and cancer risk in Europe: results from the prospective EPIC cohort study.** Lancet Planet Health 2023; 7(3): e219-e232.
117. Pan K, Luo J, Aragaki AK, Chlebowski RT. **Weight loss, diet composition and breast cancer incidence and outcome in postmenopausal women.** Oncotarget 2019; 10(33): 3088-3092.
118. Lugo D, Pulido AL, Mihos CG, Issa O, Cusnir M, Horvath SA et al. **The effects of physical activity on cancer prevention, treatment and prognosis: a review of literature.** Complement Ther Med 2019; 44: 9-13.
119. Spei ME, Samoli E, Bravi F, La Vecchia C, Bamia C, Benetou V. **Physical activity in breast cancer survivors: a systematic review and meta-analysis on overall and breast cancer survival.** Breast 2019; 44: 144-152.
120. Neil-Sztramko SE, Boyle T, Milosevic E, Nugent SF, Gotay CC, Campbell KL. **Does obesity modify the relationship between physical activity and breast cancer risk?** Breast Cancer Res Treat 2017; 166(2): 367-381.
121. Arterburn DE, Telem DA, Kushner RF, Courcoulas AP. **Benefits and risk of bariatric surgery in adults: a review.** JAMA 2020; 324(9): 879-887.
122. Wiggins T, Antonowicz SS, Markar SR. **Cancer risk following bariatric surgery: systematic review and meta-analysis of national population-based cohort studies.** Obes Surg 2019; 29(3): 1031-1039.

123. Lovrics O, Butt J, Lee Y, Lovrics P, Boudreau V, Anvari M et al. **The effect of bariatric surgery on breast cancer incidence and characteristics: a meta-analysis and systematic review.** Am J Surg 2021; 222(4): 715-722.
124. Gibb FW, Dixon JM, Clarke C, Homer NZ, Faghi AM, Andrew R et al. **Higher insulin resistance and adiposity in postmenopausal women with breast cancer treated with aromatase inhibitor.** J Clin Endocrinol Metab 2019; 104(9): 3670-3678.
125. Hassinger TE, Mehaffey JH, Hawkins JB, Schirmer BD, Hallowell PT, Schroen AT et al. **Overall and estrogen receptor-positive breast cancer incidences are decreased following bariatric surgery.** Obes Sur 2019; 29: 776-781.
126. ABESO – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e a Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade.** ABESO, 2016; 4a. ed, São Paulo, SP.
127. Iqbal J, Wu HX, Hu N, Zhou YH, Li L, Xiao F et al. **Effect of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on body weight in adults with obesity without diabetes mellitus – a systematic review and meta-analysis of randomized control trials.** Obes Rev 2022; 23(6): e13435.
128. Hu W, Song R, Cheng R, Liu C, Guo R, Tang W et al. **Use of GLP-1 receptor agonists and occurrence of thyroid disorders: a meta-analysis of randomized controlled trials.** Front Endocrinol (Lausanne) 2022; 13:927859.
129. Yang Z, Lv Y, Yu M, Mei M, Xiang L, Zhao S et al. **GLP-1 receptor agonist-associated tumor adverse events: a real-world study from 2004 to 2021 based on FAERS.** Front Pharmacol 2022; 13:925377.

130. Piccoli GF, Mesquita LA, Stein C, Aziz M, Zoldan M, Degobi NA et al. **Do GLP-1 receptor agonists increase the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis.** J Clin Endocrinol Metab 2021; 106(3): 912-921.
131. Ecker BL, Lee JY, Sterner CJ, Solomon AC, Pant DK, Shen F et al. **Impact of obesity on breast cancer recurrence and minimal residual disease.** Breast Cancer Res 2019; 21(1): 41.
132. Shaikh H, Bradhurst P, Ma LX, Cindy-Tan SY, Egger SJ et al. **Body weight management in overweight and obese breast cancer survivors.** Cochrane Database Syst Rev 2020; 12(12): CD012110.
133. Bruinsma TJ, Dyer AM, Rogers CJ, Schmitz KH, Sturgeon KM. **Effects of diet and exercise-induced weight loss on biomarkers of inflammation in breast cancer survivors: a systematic review and meta-analysis.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2021; 30(6): 1048-1062.
134. Lee K, Kruper L, Dieli-Conwright CM, Mortimer JE. **The impact of obesity on breast cancer diagnosis and treatment.** Curr Oncol Rep 2019; 21(5): 41.
135. Bhardwaj P, Au CC, Benito-Martin A, Ladumor H, Oshchepkova S, Moges R et al. **Estrogens and breast cancer: mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression.** J Steroid Mol Biol 2019; 189: 161-170.
136. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. **PIK3/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects.** Int J Mol Sci 2020; 22(1): 173.
137. Vérges B, Cariou B. **mTOR inhibitors and diabetes.** Diabetes Res Clin Pract 2015; 10(2): 101-108.

138. Anjon-Shoae J, Sadeghi O, Larijani B, Esmailzadeh A. **Dietary intake and serum levels of trans fatty acids and risk of breast cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospectives studies.** Clin Nutr 2020; 39(3): 755-764.
139. Madak-Erdogan Z, Band S, Zhao YC, Smith BP, Kulkoyluoglu-Cotul E, Zuo Q et al. **Free fatty acids rewire cancer metabolism in obesity-associated breast cancer via estrogen receptor and mTOR signaling.** Cancer Res 2019; 79(10): 2494-2510.
140. Deng CF, Zhu N, Zhao TJ, Li HF, Gu J, Liao DF et al. **Involvement of LDL and ox-LDL in cancer development and its therapeutical potential.** Front Oncol 2022; 12: 803473.
141. Li J, Wang J, Li M, Yin L, Li XA, Zhang TG. **Up-regulated expression of scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) is associated with malignant behaviors and poor prognosis of breast cancer.** Pathol Res Pract 2016; 12(6): 555-559.
142. Adhyaru BB, Jacobson TA. **Safety and efficacy of statin therapy.** Nat Rev Cardiol 2018; 15(12): 757-769.
143. Undela K, Srikanth V, Bansal D. **Statin use and risk of breast cancer: a meta-analysis of observational studies.** Breast Cancer Res Treat 2012; 135(1): 261-269
144. Mansourian M, Haghjooy-Javanmard S, Eshraghi A, Vaseghi G, Hayatshari A, Thomas J. **Statins use and risk of breast cancer recurrence and death: review and meta-analysis of observational studies.** J Pharm Sci 2016; 19(1): 72-81.

145. Beckwitt CH, Brufsky A, Oltavi ZN, Wells A. **Statin drugs reduce breast cancer recurrence and mortality.** Breast Cancer Res 2018; 20(1): 144.
146. Zhao G, Ji Y, Ye Q, Ye X, Wo G, Chen X et al. **Effects of statin use on risk and prognosis of breast cancer: a meta-analysis.** Anticancer Drugs 2022; 33(1): e507-e518.
147. Xu WH, Zhou YH. **The relationship between pos-diagnosis statin usage and breast cancer prognosis varies by hormone receptor phenotype: a systematic review and meta-analysis.** Arch Gynecol Obstet 2021; 304(5): 1315-1321.
148. Han H, Guo W, Shi W, Yu Y, Zhang Y, Ye X et al. **Hypertension and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis.** Sci Rep 2017; 20; 7: 44877.
149. Menikdiwela KR, Ramalingam L, Allen L, Scoggin S, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa S. **Angiotensin II increases endoplasmic reticulum stress in adipose tissue and adipocytes.** Sci Rep 2019; 9(1): 8481.
150. Li XY, Sun JF, Hu SQ. **The renin-angiotensin system blockers as adjunctive therapy for cancer: a meta-analysis of survival patients.** Eur Rev Med Pharmacol Sci 2017; 21(6): 1375-1383.
151. Sipahi I, Debanne SM, Rowland DY, Simon DI, Fang JC. **Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomized controlled trials.** Lancet Oncol 2010; 11(7): 627-636.
152. Raimondi S, Botteri E, Munzone E, Cipolla C, Rotmensz N, DeCensi A et al. **Use of beta-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors and**

**angiotensin receptors blockers and breast cancer survival: systematic review and meta-analysis.** Int J Cancer 2016; 139(1): 212-219.

153. Fan Y, Khan NH, Ali-Khan MF, Faysal-Ahammad MD, Zulfiqar T, Virk R et al. **Association of hypertension and breast cancer: antihypertension drugs as an effective adjunctive in breast cancer therapy.** Cancer Manag Res 2022; 14: 1323-1329.

154. Grimaldi-Bensouda L, Klungel O, Kurz X, de Groot MC, Maciel-Afonso AS, de Bruin ML et al. **Calcium channel blockers and cancer: a risk analysis using the UK Clinical Practice Research Datalink (CPRD).** BMJ Open 2016; 6(1): e009147.

155. Thakur AA, Wang X, Garcia-Betancourt MM, Forse RA. **Calcium channel blockers and the incidence of breast and prostate cancer: a meta-analysis.** J Clin Pharm Ther 2018; 43(4): 519-529.

156. Rotshild V, Raccach BH, Gazawe M, Matok I. **Calcium channel blocker use and the risk for breast cancer: a population-based nested case-control study.** Cancers (Basel) 2022; 14(9): 2344.

157. Kumar A, Mutter S, Parente EB, Harjutsalo V, Lithovius R, Mathavan S et al. **L-type calcium channel blocker increases VEGF concentrations in retinal cells and human serum.** PLoS One 2023; 18(4): e0284364.

158. Khanh VC, Fukushige M, Moriguchi K, Yamashita T, Osaka M, Hiramatsu Y et al. **Type 2 diabetes mellitus induced paracrine effects on breast cancer metastasis through extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells.** Stem Cells Dev 2020; 29(21): 1382-1394.

159. Soltani S, Abdollahi S, Aune D et al. **Body mass index and cancer risk in patients with type 2 diabetes: a dose-response meta-analysis of cohort studies.** Sci Rep 2021; 11(1): 2479.
160. Zhang M, Zucatti KP, Teixeira PP, Spiazzi BF, Correia PE, Wayerbacher LF et al. **Cancer outcomes among prediabetes and type 2 diabetes populations with dietary and physical activity-based lifestyle interventions.** J Clin Endocrinol Meta 2023; doi: 10.1210.
161. Morandi-Stumpf MA, Mancini MC, Cercato C, de Melo ME. **Letter to the editor from Stumpf et al.: Cancer outcomes among prediabetes and type 2 diabetes populations with dietary and physical activity-based lifestyle interventions.** J Clin Endocrinol Metab 2023; doi: 10.1210.
162. Foretz M, Guigas B, Viollet B. **Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential.** Nat Rev Endocrinol 2023; 19(8): 460-476.
163. Zhang ZJ, Yuan J, Bi Y, Wang C, Liu Y. **The effect of metformin on biomarkers and survivals for breast cancer – a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials.** Pharmacol Res 2019; 551-555.
164. Elsayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D et al. **Pharmacological approaches to glycemic treatment: standards of care in diabetes – 2023.** Diabetes Care 2023; 46(Suppl 1): S140-S157.
165. Coyle C, Cafferty FH, Vale C, Langley RE. **Metformin as an adjuvant treatment for cancer: a systematic review and meta-analysis.** Ann Oncol 2016; 27(12): 2184-2195.
166. Faria J, Negalha G, Azevedo A, Martel F. **Metformin and breast cancer: molecular targets.** J Mammary Gland Biol Neoplasia 2019; 24(2): 111-123.

167. Wang Q, Ma X, Long J, Du X, Pan B, Mao H. **Metformin and survival women with breast cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials.** J Clin Pharm Ther 2022; 47(3): 263-269.
168. Zhang P, Li H, Tan X, Chen L, Wang S. **Association of metformin use with cancer incidence and mortality: a meta-analysis.** Cancer Epidemiol 2013; 37(3): 207-218.
169. Xu H, Chen K, Jia X, Tian Y, Dai Y, Li D et al. **Metformin use is associated with better survival of breast cancer patients with diabetes: a meta-analysis.** Oncologist 2015; 20(11): 1236-1244.
170. Barakat HE, Hussein RR, Elberry AA, Zaki MA, Ramadan ME. **Factors influencing the anticancer effects of metformin on breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis.** Expert Rev Anticancer Ther 2022; 22(4): 415-463.
171. Lusica PM, Eugenio KP, Sacdalan DB, Jimeno CA. **A systematic review and meta-analysis on the efficacy and safety of metformin as adjunctive therapy among women with metastatic breast cancer.** Cancer Treat Res Commun 2021; 29: 100457.
172. Farkhondeh T, Amirabadizadeh A, Aramjoo H, Llorens S, Roshanravan B, Saeedi F et al. **Impact of metformin on cancer biomarkers in non-diabetic cancer patients: a systematic review and meta-analysis of clinical trials.** Curr Oncol 2021; 28(2): 1412-1423.
173. Cejuela M, Martin-Castillo B, Menendez JA, Pernas S. **Metformin and breast cancer: where are we now?** Int J Mol Sci 2022; 23(5): 2705.

174. Rahmani J, Manzari N, Thompson J, Gudi SK, Chhabra M, Naik G et al. **The effect of metformin on biomarkers associated with breast cancer outcomes: a systematic review, meta-analysis, and dose-response of randomized clinical trials.** Clin Transl Oncol 2020; 22(1): 37-49.
175. Zahid H, Simpson ER, Brown KA. **Inflammation, dysregulated metabolism and aromatase in obesity and breast cancer.** Curr Opin Pharmacol 2016; 31: 90-96.
176. Duan X, Zhou M, Zhou G, Zhu Q, Li W. **Effect of metformin on adiponectin in PCOS: a meta-analysis and a systematic review.** Eur J Ginecol Reprod Biol 2021; 267: 61-67.
177. Tseng CH. **Pioglitazone and breast cancer risk in female patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort analysis.** BMC Cancer 2022; 22(1): 559.
178. Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, Chatterjee VK, Waite KA, Eng C. **Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPAR-gamma by lovastatin and rosiglitazone.** Int J Cancer 2006; 118(10): 2390-2398.
179. Kotta-Loizou I, Giaginis C, Theocharis S. **The role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in breast cancer.** Anticancer Agents Med Chem 2012; 12(9): 1025-1044.
180. Ishay-Ronen D, Diepenbruck M, Kalathur RK, Sugiyama N, Tiede S, Ivanek R et al. **Gain fat-lose metastasis: converting invasive breast cancer cells into adipocytes inhibits cancer metastasis.** Cancer Cell 2019; 35(1): 17-32.

181. Nissen SE, Wolski K. **Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes.** N Engl J Med 2007; 356(24): 2457-2471.
182. Rosen CJ. **Revisiting rosiglitazone story – lessons learned.** N Engl J Med 2010; 363(9): 803-806.
183. De Fronzo RA, Inzucchi S, Abdul-Ghani M, Nissen SE. **Pioglitazone: the forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes.** Diab Vasc Dis Res 2019; 16(2): 133-143.
184. Lewis JD, Habel LA, Quesenberry CP, Strom BL, Peng T, Hedderson MM et al. **Pioglitazone use and risk of bladder cancer and other common cancers in persons with diabetes.** JAMA 2015; 14(3): 265-277.
185. Vaccaro O, Masulli M, Nicolucci A, Bonora E, Del Prato S, Maggioni AP et al. **Effects on the incidence of cardiovascular events of the addition of pioglitazone versus sulfonylureas in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (TOSCAT.IT): a randomized, multicentre trial.** Lancet Diabetes Endocrinol 2017; 5(11): 887-897.
186. Tseng CH. **Rosiglitazone reduces breast cancer risk in Taiwanese female patients with type 2 diabetes.** Oncotarget 2017; 8(2): 3042-3048.
187. Halpern B, Mancini MC, de Melo NE, Lamounier RN, Moreira RO, Carra MK et al. **Proposal of an obesity classification based on weight history: an official document by the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) and the Brazilian Society for the Study of Obesity and Metabolic Syndrome (ABESO).** Arch Endocrinol Metab 2022; 66(2): 139-151.

188. Maruthur NM, Bolen S, Brancati FL, Clark JM. **Obesity and mammography: a systematic review and meta-analysis.** J Gen Intern Med 2009; 24(5): 665-667.
189. Sommer I, Teufer B, Szelag M, Nussbaumer-Streit B, Titscher V, Klerings I et al. **The performance of anthropometric tools to determine obesity: a systematic review and meta-analysis.** Sci Rep 2020; 10(1): 12699.
190. Lo K, Huang YQ, Shen G, Huang JY, Liu L, Yu YL et al. **Effects of waist to height ratio, waist circumference, body mass index on the risk of chronic diseases, all-cause, cardiovascular and cancer mortality.** Postgrad Med 2021; 97(1147): 306-311.
191. Flegal KM, Kit BK, Orpana H, Graubard BI. **Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis.** JAMA 2013; 309(1): 71-82.
192. Iyengar NM, Brown KA, Zhou XK, Gucalp A, Subbaramaiah K, Giri DD et al. **Metabolic obesity, adipose inflammation and elevated breast aromatase in women with normal body mass index.** Cancer Prev Res (Phila) 2017; 10(4): 235-243.
193. Hadjiyannakis S, Ibrahim Q, Li J, Ball GD, Buchholz A, Hamilton JK et al. **Obesity class versus Edmonton Obesity Staging System for pediatrics to define health risk in childhood obesity: results from the CANPWR cross-sectional study.** Lancet Child Adolesc Health 2019; 3(6): 398-407.
194. Ogassavara NC, Magalhães-Dias JG, Pajecki D, Siqueira JO, Santo MA, Tess BH. **The Edmonton Obesity Staging System: assessing a potential**

**tool to improve the management of obesity surgery in the Brazilian public health services.** Surg Obes Relat Dis 2020; 16(1): 40-47.

195. Atlantis E, Fahey P, Williams K, Edwards S, Samaras K, Dugdale P et al. **Comparing the predictive ability of the Edmonton Obesity Staging System with the body mass index for the use of health services and pharmacotherapies in Australian adults: a nationally representative cross-sectional study.** Clin Obes 2020; 10(4): e12368.

196. Rodríguez-Flores M, Goicochea-Turcott EW, Mancillas-Adame L, Garibay-Nieto N, López-Cervantes M, Rojas-Russel ME et al. **The utility of the Edmonton Obesity Staging System for the prediction of COVID-19 outcomes: a multi-center study.** Int J Obes (London) 2022; 46(3): 661-668.

197. Markkula A, Bromée A, Henningson M, Hietala M, Ringberg A, Ingvar C et al. **Given breast cancer, does breast size matter? Data from a prospective breast cancer cohort.** Cancer Causes Control 2012; 23(8): 1307-1316.

198. Amadou A, Ferrari P, Muwonge R, Moskal A, Biessy C, Romieu I et al. **Overweight, obesity and the risk of premenopausal breast cancer according to ethnicity: a systematic review and dose-response meta-analysis.** Obes Rev 2013; 14: 665-678.

199. Iyengar NM, Arthur R, Manson JE, Chlebowski RT, Kroenke CH, Peterson L et al. **Association of body fat and risk of breast cancer in postmenopausal women with normal body mass index: a secondary analysis of a randomized clinical trial and observational study.** JAMA Oncol 2019; 5(2): 155-163.

200. Premenopausal Breast Cancer Collaborative Group; Schoemaker MJ, Nichols HB, Wright LB, Brook MN, Jones ME et al. **Association of body mass index and age with subsequent breast cancer risk in premenopausal women.** JAMA Oncol 2018; 4(11): e181771.
201. Martinez-Tapia CM, Diot T, Oubaya N, Paillaud E, Poisson J, Gisselbrecht M et al. **The obesity paradox for mid and long-term mortality in older cancer patients: a prospective multicenter cohort study.** Am J Clin Nutr 2020; doi: 10.1093/ajcn/nqaa238.

## APÊNDICE I

### **Uma visão geral da via de sinalização da PI3K em mulheres com câncer de mama receptor de estrógeno positivo/HER2 negativo e obesidade**

Flavio Fontes Pirozzi, Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

#### **Resumo**

O aumento de peso é uma doença crônica não transmissível mais prevalente na população mundial. O excesso de peso atinge cerca da metade da população brasileira e destes quase um quinto dos pacientes apresentam índice de massa corpórea de obesidade. A obesidade é um fator de risco para o surgimento de diversas outras doenças metabólicas e também doenças neoplásicas, entre elas o câncer de mama. Entre as mulheres, o câncer de mama é a neoplasia de maior incidência nesse gênero. Estudos epidemiológicos correlacionam a obesidade e o risco de câncer de mama em mulheres pós menopausa. A hiperexpressão da via de sinalização da PI3K está relacionada com hiperinsulinemia, hiperleptinemia e aumento da atividade da aromatase. Por serem doenças multifatoriais, variantes genéticas do *PIK3CA* estão associadas em ambas as patologias. Estudos recentes apontam alterações deste gene como fatores prognóstico do câncer de mama e também como um alvo terapêutico em casos resistentes ao tratamento medicamentoso

convencional. Mais estudos relacionando alterações genéticas com obesidade e câncer de mama apontam a avaliação do ganho de peso como um fator prognóstico negativo e a perda de peso e atuais e futuros tratamentos com alvo genético como importantes fatores relacionados ao aumento nas taxas de sobrevida dessas pacientes.

Palavras chave: câncer de mama, obesidade, PIK3CA, aromatase

## **Introdução**

A obesidade é um dos principais problemas de saúde público da atualidade e a doença crônica não transmissível mais prevalente na nossa população (APOVIAN et al., 2015). Nas últimas décadas, o número de pacientes obesos aumentou mais que duas vezes na maioria dos países. Uma maneira de classificar de forma quantitativa a obesidade é através do cálculo do índice de massa corpórea (IMC), a relação do peso do paciente (em quilogramas) dividido pela altura (em metro) ao quadrado. Considera-se obesidade quando o IMC está  $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$  e ela é subdividida em obesidade grau I (IMC entre 30 e  $34,9 \text{ Kg/m}^2$ ), obesidade grau II (IMC entre 35 e  $39,9 \text{ Kg/m}^2$ ) e obesidade grau III ou obesidade mórbida ( $\text{IMC} \geq 40 \text{ Kg/m}^2$ ). Cerca de 40% da população americana apresenta  $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ . No Brasil, dados recentes do Ministério da Saúde mostram que cerca de 20% da população apresenta o mesmo índice de obesidade e cerca de metade da população está acima do peso (sobrepeso

e obesidade, ou seja,  $IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$ ) (NCR RISK FACTOR COLLABORATION, 2016; VIGITEL BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A obesidade consiste no acúmulo de tecido gorduroso acima da normalidade, em especial a gordura visceral. O excesso de adipócitos acarreta um importante incremento no risco de doenças associadas com a obesidade como diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial (HAS), dislipidemia (DLP), osteoartropatias, apneia do sono e o câncer (KRANENDONK et al., 2015; GURNANI, BIRKEN, HAMILTON, 2015). Recente, a obesidade foi correlacionada como um fator de risco independente para 13 diferentes de neoplasias, entre elas o câncer de mama (CM) (PUCKETT et al., 2016). Estima-se que pouco menos da metade dos cânceres tenham relação direta com a obesidade como principal fator de risco e que, contrário também é verdadeiro, pois a perda de peso - por métodos clínicos e cirúrgicos - apresentam redução na incidência dessas doenças (AZRAD et al., 2019; PAN et al., 2019; HASSINGER et al., 2019)

Um tipo de neoplasia muito bem correlacionado com a obesidade é o CM. Segundo os últimos dados do Instituto do Câncer do Brasil, o CM é a neoplasia mais comum entre as mulheres (cerca de 20% de todas as neoplasias do gênero). Dados mundiais demonstravam que, o CM, era responsável por 25% de todos os casos de neoplasia e 15% das mortes causadas diretamente pelo câncer (MS - INCA, 2018). Se por um lado a obesidade tem um fator de proteção para o CM em mulheres pré-menopausa, este risco aumenta de forma significativa no período pós-menopausa (AYOUB et al., 2019). Apesar da limitação do IMC na quantificação da obesidade, pesquisa aponta que um

incremento de 5 Kg/m<sup>2</sup> neste índice determina um aumento de 12% no risco de CM em mulheres pós menopausa (RENEHAN et al., 2008). Mulheres obesas apresentam um risco muito maior para o desenvolvimento do CM, especialmente aquelas com obesidade grau II e III. Paciente obesas apresentam um risco de desenvolver CM duas vezes maior do que mulheres com IMC dentro da normalidade. Mulheres com IMC  $\geq 35$  Kg/m<sup>2</sup> também apresentam maior risco de doença neoplásica avançada, maior aumento tumoral e maiores taxas de metástases regionais. Além do impacto negativo do aumento de gordura abdominal (que pode ser avaliado clinicamente pela medida da circunferência abdominal), a quantidade de gordura no entorno da glândula mamária parece ter um importante papel na fisiopatologia da doença. O ganho de peso, assim como o período que a mulher permanece no estágio de sobrepeso e obesidade são importantes fatores de risco para o desenvolvimento do CM (AYOUB et al., 2019; ZHANG et al., 2019).

Os ovários são os principais sítios de produção estrogênica no período pré-menopausa. Após a menopausa, a principal fonte de secreção de hormônios sexuais são as glândulas adrenais que produzem andrógenos que são convertidos em estrógeno pela aromatase. Indiretamente, a obesidade está associada a uma maior produção estrogênica pela maior expressão da aromatase no tecido gorduroso visceral e devido à redução na formação da principal proteína de carregamento dos hormônios sexuais na circulação, a SHBG. O aumento de andrógenos livres e a maior atividade da aromatase tem um importante impacto no aumento da incidência de CM em mulheres obesas no período pós menopausa (SIMPSON, BROWN, 2013).

Sabe-se que a obesidade leva a um estado de resistência a determinados hormônios, alterações metabólicas, disfunção na secreção de substâncias produzidas pelo tecido adiposo e uma inflamação subaguda. O aumento sérico da insulina e a leptina é determinado pela resistência a estes hormônios e, conseqüentemente, o aumento na secreção de fatores de crescimento como o IGF-I em decorrência do estado de resistência à insulina. Tanto a resistência a ação da insulina, como a resistência a ação da leptina levam a um estado de hiperinsulinemia e hiperleptinemia provocando um aumento na expressão de seus respectivos receptores e maior ação mitogênica ativando vias canônicas importantes como a via de sinalização da fosfoinositida 3-quinase (PI3K) (SIMONE et al., 2016).

Alterações genéticas no gene *PIK3CA* estão relacionados, isoladamente, com obesidade e CM, e estudos mais recentes fazem uma correlação com esta variante e com essas duas doenças (GONCALVEZ et al., 2018). Este artigo tem o objetivo de rever o processo fisiopatológico da obesidade, alterações hormonais relacionadas com o ganho de peso e a relação com o maior risco do CM e suas complicações.

### **Obesidade e resistência à insulina**

A obesidade e o aumento de adipócitos apresentam uma importante relação com a resistência a ação da insulina e, conseqüentemente, o estado de hiperinsulinemia. Assim como o aumento da insulina, outros fatores de

crescimento também se apresentam com seus níveis elevados, como o fator de crescimento insulina-*like* (IGF-I). A insulina e o IGF-I são hormônios proteicos que se ligam em receptores de superfície celular tipo tirosinoquinase. A resistência a ação da insulina é uma importante consequência com a obesidade e tende a se agravar com o aumento do IMC. A resposta genética e ambiental em detrimento da resistência insulínica é um fator preponderante para o desenvolvimento de complicações como DM2, HAS e DLP (BARAZZONI et al., 2018).

O aumento do IGF-I leva a um consequente aumento destes receptores tirosinoquinase para insulina e ambos acabam agindo em sinergismo. Estudos demonstram que a inibição de proteínas de carregamento do IGF-I (as IGFBPs) reduz o crescimento tumoral em animais e, isso sugere que, este tipo de mecanismo possa ser possível e interessante no tratamento do CM em humanos. Estudos *in vitro* com linhagens celulares de CM provou que, em uma situação semelhante a encontrada na resistência insulínica, ocorre uma maior oxidação de glicose intratumoral e maior divisão celular (SIMONE et al., 2016).

O IGF-I age de forma sinérgica com o estradiol e potencializa o crescimento celular glândula mamária pela ativação do c-MYC, CCND e vias canônicas como RAS/MEK/MAPK/ERK1/2 e PI3K/AKT/mTOR. Com isso, ocorre uma maior fosforilação dos receptores de estrogênio (ER) e de IGF-I (IGFIR) e, uma maior atividade pela via da mTOR, apontam para uma maior progressão da doença neoplásica, maiores taxas de recorrência, menores taxas de sobrevivência e com menor efeito ao tratamento com o tamoxifeno, um antagonista do ER na mama.

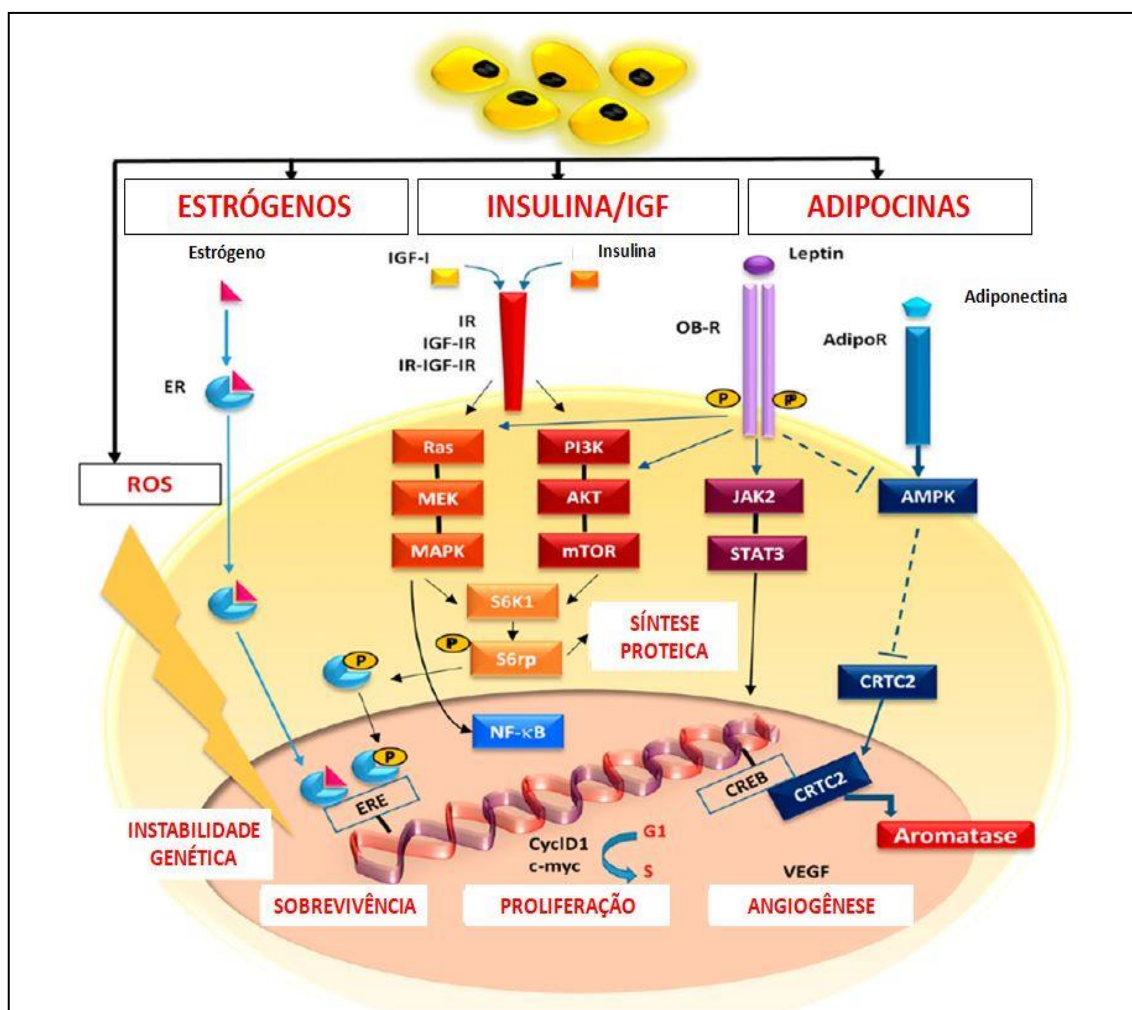
Estudo recente, em mulheres com CM/ER+ pós menopausa que estavam em uso de algum inibidor da aromatase (anastrozol, letrozol ou exemestane) mostrou um maior depósito de tecido gorduroso corporal e maior resistência insulínica ao longo do tratamento, o que poderia perpetuar a ativação de toda esta cascata molecular (CALLE, KAAKS, 2004).

### **Obesidade e resistência à leptina**

A leptina é um hormônio produzido nos adipócitos que tem um importante papel no controle do apetite, aumentando a saciedade. Após a alimentação existe um aumento dos níveis séricos de leptina que se ligam a receptores de leptina (LEPR) em neurônios anorexígenos no hipotálamo, chamados neurônios POMC. Assim como ocorre a resistência à insulina em pacientes obesos, estes mesmos indivíduos vão apresentar resistência a ação da leptina e, conseqüentemente, apresentarão um estado de hiperleptinemia. A resistência a leptina leva a uma perda do controle do apetite no sistema nervoso central e, conseqüentemente, aumento da fome e ganho de peso. Além da associação com fatores de risco adquiridos, problemas genéticos podem estar relacionados como os polimorfismos nos genes da leptina (*LEP*) e do LEPR, provocando deficiência e resistência genética à leptina, respectivamente, e também aumento do peso. Apesar da descoberta desses polimorfismos em animais e a associação com a obesidade, são raros os casos

descritos em seres humanos destes distúrbios genéticos (CUI, LÓPEZ, RAHMOUNI, 2017).

Estudos mostram que o aumento da leptina, independente da etiologia, está fortemente relacionado com o desenvolvimento do CM. Diferentes alelos polimórficos estão relacionados com o CM em mulheres em diferentes partes do mundo. Estudos demonstram que, a hiperleptinemia diminui a fosforilação da AMPK, que aumenta a produção da aromatase, e ativa vias como MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT/mTOR e JAK2/STAT3 que estão relacionadas com o aumento da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, migração, invasão e também o aumento da atividade da aromatase no tecido gorduroso (Figura 1) (SIMONE et al., 2016; GUO et al., 2012).



**Figura 1:** Vias moleculares ativadas relacionando câncer de mama e obesidade. Alterações nos níveis de estrógeno, as vias relacionadas com o eixo da insulina, IGF-I, leptina e outras adipocinas, por diferentes vias intracelulares desencadeando aumento na produção de aromatase (Figura adaptada de Simone V et al. The Oncologist 2016)

### Variantes do gene *PIK3CA* e Câncer de Mama

Resistência ao tratamento hormonal é um fato comum em mulheres com CM avançado com receptores hormonais positivos (ZHANG et al., 2020). Por este motivo, novos alvos terapêuticos e biomarcadores são necessários para decidir como dar sequência ao tratamento dessas pacientes. A hiperexpressão da via de sinalização da PIK3 está muito bem correlacionada com CM avançado e

resistência ao tratamento hormonal. Este aumento da atividade desta via está relacionado com mutações ou amplificações no gene *PIK3CA* e estas variantes também estão envolvidas com o CM avançado, resistência ao tratamento hormonal e pior prognóstico (SOBRAL-LEITE et al., 2019; VASAN, TOSKA, SCALTRITI, 2019). Pacientes com mutação do *PIK3CA* e *TP53* apresentam menores taxas de sobrevida e essa comutação poderia ser um marcador prognóstico para pacientes pós terapia neoadjuvante (CHEN et al., 2019). Cerca de 70% das pacientes com CM apresentam uma imuno-histoquímica com receptor hormonal-positivo e HER2-negativo (HOWLADER et al., 2014). Pacientes com CM e com esta imuno-histoquímica são forte candidatas para usarem um inibidor da PIK3 já que, quase 40% delas apresentam mutações no gene *PIK3CA* (MOLLON et al., 2018).

Um estudo recente fase III em 527 mulheres com CM avançado (sendo que 341 tinham mutações no gene *PIK3CA* confirmadas, ou seja 64,7% das pacientes) que já vinham recendo terapia hormonal, comparou o uso de alpesilibe (um inibidor específico da PIK3-alfa) associado com fulvestrante (um degradador do receptor estrogênico usado em casos de CM com receptor hormonal positivo e HER2 negativo), em comparação com placebo associado com fulvestrante. Nas pacientes com o gene *PIK3CA* mutado, o grupo alpesilibe-fulvestrante, em comparação com o grupo placebo-fulvestrante apresentou maior taxa de sobrevida (ANDRÉ et al., 2019).

### **Variantes do gene *PIK3CA*, câncer de mama e obesidade**

A obesidade é uma doença crônica, inflamatória, subaguda, de etiologia multifatorial, na qual estão envolvidos fatores genéticos e ambientais. Na questão genética, apesar de existir formas monogênicas de obesidade e síndromes genéticas relacionadas com a obesidade, a principal influência genética envolvida com o aumento de peso é poligênica conferindo maior susceptibilidade de acordo com a dieta, os hábitos alimentares e maior risco de desenvolver distúrbios metabólico (GRÜN, 2010). Estudo aponta mais de 400 genes envolvidos na gênese da obesidade com *loci* em todos os cromossomos, com exceção do cromossomo Y (KIM et al., 2016).

Entre esses genes, variações genéticas que como do *PIK3CA* também estão correlacionados com outras doenças. As variantes do gene *PIK3CA* e suas vias de sinalização estão presentes em complicações relacionadas com a obesidade, como o DM2 (XUEYAO et al., 2017). Entre as neoplasias, além do CM (GONCALVEZ et al., 2018), há relatos na literatura associando essa variante genética com câncer de intestino (MARTINEZ-USEROS, GARCIA-FONCILLAS, 2016), colo do útero (GRIGSBY et al., 2018), endométrio (WESTIN et al., 2015) e ovário (ZHANG, ZHOU, 2019).

Apesar de todo este embasamento teórico, existem poucos relatos na literatura associando variantes genéticas do gene do *PIK3CA*, obesidade e CM. Em um estudo que analisou 13 genes relacionados com a obesidade (*ADIPOQ*, *IGF1*, *INS*, *IRS1*, *LEP*, *LEPR*, *LEPROT*, *PIK3CA*, *PIK3R5*, *PTEN*, *TSC1*, *TSC2* e *AKT1*) em amostras de 1019 mulheres com CM em estágios I a II, uma variante

intrônica do *PIK3CA* (rs267776) foi associada piores taxas de sobrevivência livre da doença (PANDE et al., 2014). Além do fato de existir essa correlação, e a maioria das pacientes com CM apresentarem um perfil imuno-histoquímico com receptor hormonal-positivo e HER2-negativo, e boa parte dessas terem mutações no gene da *PIK3CA*, estudos mostram que existe uma importante relação com o aumento do IMC em pacientes com este subtipo de CM, mostram que a obesidade tem um impacto negativo em relação ao prognóstico desta população analisada (KIM et al., 2019).

## **Conclusão**

Alterações na via de sinalização da PIK3-AKT-mTOR correlacionam o excesso de peso e CM, doença metabólica que está presente em cerca de metade da população brasileira e a neoplasia maligna mais frequente no sexo feminino, respectivamente. Estudos epidemiológicos mostram uma importante correlação entre obesidade e CM. Apesar de não existir estudos mostrando a prevalência de alterações genéticas do *PIK3CA* em pacientes obesos, cerca de 70% das pacientes com CM apresentam receptor hormonal-positivo e HER2-negativo e, destes 40% apresentam mutações no gene *PIK3CA*. Apesar de todas essas associações, ainda existem poucos estudos de variantes genéticas desta alteração em pacientes com excesso de peso e CM. Os poucos estudos que fazem este tipo de correlação entre essas variantes genéticas com obesidade e CM mostram que polimorfismos deste gene não só está

relacionado com a fisiopatologia dessas doenças, como também ao prognóstico do CM.

### **Referências bibliográficas**

André F, Ciruelos E, Rubovszhy G et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2019; 380: 1929-1940.

Apovian CM, Arrone LJ, Bessesen DH et al. Pharmacological management of obesity: and Endocrine Society clinical practice guideline.

Azrad M, Blair CK, Rock CL et al. Adult weight gain accelerates the onset of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 176(3): 649-656.

Ayoub NM, Yaghan RJ, Abdo NM et al. Impact of obesity on clinicopathologic characteristics and disease prognosis in pre and postmenopausal breast cancer patients: a retrospective institutional study. *J Obesity* 2019; 25;2019.

Barazzoni R, Cappelari GG, Ragni M et al. Insulin resistance in obesity: a overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord* 2018; 32(2): 149-157.

Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 579-591.

Chen X, Guo Y, Ouyang T et al. Co-mutation of TP53 and PIK3CA in residual disease after neoadjuvant chemotherapy is associated with poor survival in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145(5): 1235-1242

Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13(6): 338-351.

Goncalvez MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-Kinase, growth disorders, and cancer. *New Engl J Med* 2018; 379: 2052-2062.

Grisgby P, Elhammali A, Ruiz F et al. Clinical outcomes and differential effects of PIK3 pathway mutation in obese versus non-obese patients with cervical cancer. *Oncotarget* 2018; 9(3): 4061-4073.

Gurnani M, Birken C, Hamilton J. Childhood obesity: causes, consequences and management. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62(4): 821-840.

Hassinger TE, Mehaffey JH, Hawkins RB et al. Overall and estrogen receptor-positive breast cancer incidences are decreased following bariatric surgery. *Obesity Surg* 2019; 29: 776-781.

Howlader N, Altekruse SF, Li CI et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst* 214; 106(5): dju055.

Guo S, Liu M, Wang G et al. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825: 207-222.

Grün F. Obesogens. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 453-459.

Kim JY, DeMenna JT, Puppala S et al. Physical activity and FTO genotype by physical activity interactive influences on obesity. *BMC Genet* 2016; 17:47. doi: 10.1186/s12863-016-0357-6.

Kim JY, Lee DW, Lee KH et al. Prognostic role of body mass index is different according to menopausal status and tumor subtype in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 176: 453-460.

Kranendonk ME, Van Herwaarden JA, Stupkova T et al. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depot relate differently to metabolic risk factors of cardiovascular disease: distinct fat depots and vascular risk factors. *Atherosclerosis* 2015; 239(2): 419-427.

Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med* 2016; 14:21.

Mollon I, Aguilar A, Anderson E et al. A systematic literature review of the prevalence of PIK3CA mutations and mutation hotspots in HR+/HER2-metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2018; 78(13): 1207.

MS - INCA. Ministério da Saúde (MS) e Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018 - Incidência do Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2018.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1377-1396.

Pan K, Luo J, Aragaki AK et al. Weight loss, diet composition and breast cancer incidence and outcome in postmenopausal women. *Oncotarget* 2019; 10(33): 3088-3092.

Pande M, Bondy ML, Do KA et al. Association between germline single nucleotide polymorphisms in the PI3K-AKT-mTOR pathway, obesity, and breast cancer disease free survival. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 147(2): 381-387.

Puckett M, Neri A, Underwood JM, Stewart S. Nutrition and physical activity strategies for cancer prevention in current national comprehensive cancer control program plans. *Journal of Community Health*, 2016; 41(5): 1013-1020.

Renahan AG, Tyson M, Egger M et al. Body mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569-578.

Simone V, D'Avenia M, Argentiero A et al. Obesity and breast cancer: molecular interconnections and potential clinical applications. *The Oncologist* 2016; 21: 404-417.

Simpson ER, Brown KA. Obesity and breast cancer: role of inflammation and aromatase. *J Mol Endocrinol* 2013; 51: T51-T59.

Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M et al. Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancer: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res* 2019; 21:90.

Varsan N, Toska E, Scaltriti M. Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2019; Suppl 10: x3-x11.

VIGITEL Brasil 2016. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito por telefone: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde - Brasília; Ministério da Saúde, 2017.

Westin SN, Ju Z, Broaddus RR et al. PTEN loss is a context-dependent outcome determinant in obese and non-obese endometrioid endometrial cancer patients. *Molecular Oncology* 2015; 9: 1649-1703.

Xueyao X, Zhyie X, Ziyi Z et al. Association of PIK3/AKT/mTOR pathway genetic variants with type 2 diabetes mellitus in Chinese. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2017; 128: 127-135.

Zhang J, Wang Q, Wang Q et al. Mechanisms of resistance to estrogen receptor modulators in ER+/HER2- advanced breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 559-572.

Zhang H, Zhou L. Single nucleotide polymorphism of PIK3CA and its interaction with the environment are risk factors for Chinese Han ovarian cancer. *Pathology – Research and Practice* 2019; 215: 152520.

Zhang M, Zhang X, Liu J et al. Body mass index and diabetes are important prognostic signatures for bilateral breast cancer prognosis. *J Cell Biochem* 2019; doi: 10.1002/jcb.28011.

## APÊNCICE II

### **Obesidade e câncer de mama: revisão de literatura**

Flavio Fontes Pirozzi; Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

#### **Resumo:**

O sobrepeso e a obesidade é uma doença crônica e multifatorial que atinge grande parte da população mundial. O ganho de peso está relacionado ao aumento no risco de desenvolvimento de diversas complicações, entre elas o câncer de mama. O câncer de mama é a neoplasia mais comum no sexo feminino e a segunda causa de mortalidade entre todas as doenças neoplásicas. Vias metabólicas, genéticas e moleculares estão correlacionadas com a obesidade e o câncer de mama. O aumento de peso está relacionado com resistência à insulina e a leptina, aumento de fatores de crescimento (IGF-I) e citocinas inflamatórias (TNF-alfa e interleucinas) e redução da adiponectina e da melatonina que estão associados com aumento da aromatase e distúrbios relacionados a proliferação celular. Compreender essas alterações e as suas vias moleculares pode ser a chave para entender melhores maneiras de prevenir e novas opções terapêuticas para o tratamento do câncer de mama.

Key words: obesidade, sobrepeso, fator de risco, câncer de mama, aromatase

## Introdução

A obesidade é um dos principais problemas de saúde pública da atualidade. Nas últimas décadas, o número de pacientes obesos aumentou mais que duas vezes na maioria dos países. Uma maneira de classificar de forma quantitativa a obesidade é através do cálculo do índice de massa corpórea (IMC), a relação do peso do paciente (em quilogramas) dividido pela altura (em metro) ao quadrado. Considera-se obesidade quando o IMC está  $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$  e ela é subdividida em obesidade grau I (IMC entre 30 e 34,9  $\text{Kg/m}^2$ ), obesidade grau II (IMC entre 35 e 39,9  $\text{Kg/m}^2$ ) e obesidade grau III ou obesidade mórbida (IMC  $\geq 40 \text{ Kg/m}^2$ ). Cerca de 40% da população americana apresenta IMC  $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ . No Brasil, dados recentes do Ministério da Saúde mostram que cerca de 20% da população apresenta o mesmo índice de obesidade e cerca de metade da população está acima do peso (sobrepeso e obesidade, ou seja, IMC  $\geq 25 \text{ Kg/m}^2$ ).

A obesidade consiste no acúmulo de tecido gorduroso acima da normalidade, em especial a gordura visceral. O excesso de adipócitos acarreta um importante incremento no risco de doenças associadas com a obesidade como diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia, osteoartropatias, apneia do sono e o câncer. Recente, a obesidade foi correlacionada como um fator de risco independente para 13 diferentes de neoplasias, entre elas o câncer de mama (CM). Estima-se que pouco menos da metade dos cânceres tenham relação direta com a obesidade como principal fator de risco. Estudos também apontam que o contrário também é verdadeiro,

pois a perda de peso - por métodos clínicos e cirúrgicos - apresentam redução na incidência dessas doenças.

Um tipo de neoplasia muito bem correlacionado com a obesidade é o CM. Segundo os últimos dados do Instituto do Câncer do Brasil, o CM é a neoplasia mais comum entre as mulheres (cerca de 20% de todas as neoplasias do gênero). Dados mundiais demonstravam que, o CM, era responsável por 25% de todos os casos de neoplasia e 15% das mortes causadas diretamente pelo câncer. Se por um lado a obesidade tem um fator de proteção para o CM em mulheres pré-menopausa, este risco aumenta de forma significativa no período pós-menopausa. Apesar da limitação do IMC na quantificação da obesidade, pesquisa aponta que um incremento de 5 Kg/m<sup>2</sup> neste índice determina um aumento de 12% no risco de CM em mulheres pós-menopausa. Mulheres obesas apresentam um risco muito maior para o desenvolvimento do CM, especialmente aquelas com obesidade grau II e III. Paciente obesas apresentam um risco de desenvolver CM duas vezes maior do que mulheres com IMC dentro da normalidade. Mulheres com IMC  $\geq 35$  Kg/m<sup>2</sup> também apresentam maior risco de doença neoplásica avançada, maior aumento tumoral e maiores taxas de metástases regionais. Além do impacto negativo do aumento de gordura abdominal (que pode ser avaliado clinicamente pela medida da circunferência abdominal), a quantidade de gordura no entorno da glândula mamária parece ter um importante papel na fisiopatologia da doença. O ganho de peso, assim como o período que a mulher permanece no estágio de sobrepeso e obesidade são importantes fatores de risco para o

desenvolvimento do CM. Há uma importante correlação entre ganho de peso e mutações nos genes *BRCA*.

Os ovários são os principais sítios de produção estrogênica no período pré-menopausa. Após a menopausa, a principal fonte de secreção de hormônios sexuais são as glândulas adrenais que produzem andrógenos que são convertidos em estrógeno pela aromatase. Indiretamente, a obesidade está associada a uma maior produção estrogênica pela maior expressão da aromatase no tecido gorduroso visceral e devido à redução na formação da principal proteína de carregamento dos hormônios sexuais na circulação, a SHBG. O aumento de andrógenos livres e a maior atividade da aromatase tem um importante impacto no aumento da incidência de CM em mulheres obesas no período pós menopausa.

Sabe-se que a obesidade leva a um estado de resistência a determinados hormônios, alterações metabólicas, disfunção na secreção de substâncias produzidas pelo tecido adiposo e uma inflamação subaguda. O aumento sérico da insulina e a leptina é determinado pela resistência a estes hormônios e, conseqüentemente, o aumento na secreção de fatores de crescimento como o IGF-I em decorrência do estado de resistência à insulina. O tecido gorduroso visceral é responsável pelo aumento da secreção de adipocinas pró inflamatórias e também ocorre uma redução de adiponectina, uma adipocina que aumenta a sensibilidade à insulina. A expansão do tecido gorduroso leva a um estado inflamatório subagudo com presença de infiltrado de macrófagos junto aos adipócitos em pacientes obesos com subsequente aumento de citocinas inflamatórias (como TNF-alfa e IL-6) e ácidos graxos livres.

A privação do sono, a exposição a luz artificial no período noturno e os trabalhos de turno que invertem o ciclo circadiano tem um importante papel na fisiopatologia da obesidade. Essas alterações levam a um estado de redução na produção de melatonina. Estudos apontam que mulheres quem trabalham em turnos não só apresentam maior risco de ganho de peso, mas também para o desenvolvimento do CM.

Alterações moleculares ocorrem na obesidade e podem ser determinantes no surgimento de neoplasias relacionadas com o ganho de peso. Compreender essas vias que estão relacionadas com a fisiopatologia da obesidade são de grande importância para o estudo da relação desta doença com o surgimento de neoplasias, especialmente o CM. Nos próximos tópicos discutiremos de forma isolada cada tópico para tentar compreender essas vias moleculares e seu papel no CM.

### **Vias moleculares relacionadas a obesidade e ao CM**

#### **a) Insulina e IGF-I**

A obesidade e o aumento dos adipócitos apresentam uma importante relação com a resistência à insulina e, conseqüentemente, o estado de hiperinsulinemia. Assim como o aumento da insulina, outros fatores de crescimento também se apresentam com seus níveis elevados, como o fator de crescimento insulina-*like* (IGF-I). A insulina e o IGF-I são hormônios proteicos que se ligam em receptores de superfície celular tipo tirosinoquinase. O

aumento do IGF-I leva a um consequente aumento destes receptores tirosinoquinase para insulina e ambos acabam agindo em sinergismo. Estudos demonstram que a inibição de proteínas de carregamento do IGF-I (as IGFBPs) reduz o crescimento tumoral em animais e, isso sugere que, este tipo de mecanismo possa ser possível e interessante no tratamento do CM em humanos. Estudos *in vitro* com linhagens celulares de CM provou que, em uma situação semelhante a encontrada na resistência à insulina, ocorre uma maior oxidação de glicose intratumoral e maior divisão celular.

O IGF-I age de forma sinérgica com o estradiol e potencializa o crescimento celular glândula mamária pela ativação do c-MYC, CCND e vias canônicas como RAS/MEK/MAPK/ERK1/2 e PI3K/AKT/mTOR. Com isso, ocorre uma maior fosforilação dos receptores de estrogênio (ER) e de IGF-I (IGFIR) e, uma maior atividade pela via da mTOR, apontam para uma maior progressão da doença neoplásica, maiores taxas de recorrência, menores taxas de sobrevivência e com menor efeito ao tratamento com o tamoxifeno, um antagonista do ER na mama. Estudo recente, em mulheres com CM/ER+ pós menopausa que estavam em uso de algum inibidor da aromatase (anastrozol, letrozol ou exemestane) mostrou um maior depósito de tecido gorduroso corporal e maior resistência insulínica ao longo do tratamento, o que poderia perpetuar a ativação de toda desta cascata molecular.

Nas fases iniciais da resistência à insulina, a hiperinsulinemia consegue manter os valores glicêmicos dentro da normalidade. Por fatores genéticos e/ou ambientais (entre eles a obesidade), o surgimento da falência pancreática e a consequente redução na produção de insulina, pode acarretar em um estado

hiperglicemia e o diagnóstico do DM2. Estudo demonstrou que o valor da glicemia de jejum e da glicemia 2 horas pós prandial estão positivamente associadas com o CM. Tanto a hiperinsulinemia, como a hiperglicemia, aumentam o risco para o desenvolvimento do CM por diferentes vias, como a WNT/ $\beta$ -catenina que ativa genes alvos como o *CCND1* e *c-MYC*. Variantes no fator de transcrição 7-like 2 (TCF7L2), responsável por regular a produção hepática de glicose, e que ativam a via WNT/ $\beta$ -catenina, estão associados com maior risco para o desenvolvimento do DM2. Polimorfismos genéticos do gene *TCF7L2* e a elevação do valor da glicemia aumentam a sinalização da via WNT/ $\beta$ -catenina acarretando o aumento do risco no desenvolvimento do câncer, especialmente o CM.

#### b) Leptina

A leptina é um hormônio produzido nos adipócitos que tem um importante papel no controle do apetite, aumentando a saciedade. Assim como ocorre a resistência à insulina em pacientes obesos, estes mesmos indivíduos vão apresentar resistência a ação da leptina e, conseqüentemente, apresentarão um estado de hiperleptinemia. A resistência a leptina leva a uma perda do controle do apetite no sistema nervoso central e, conseqüentemente, aumento da fome e ganho de peso. Além da associação com fatores de risco adquiridos, problemas genéticos podem estar relacionados como os polimorfismos nos genes da leptina (*LEP*) e do receptor da leptina (*LEPR*), provocando deficiência e resistência genética à leptina, respectivamente, e também aumento do peso. Apesar da descoberta desses polimorfismos em animais e a associação com a

obesidade, são raros os casos descritos em seres humanos destes distúrbios genéticos.

Estudos mostram que o aumento da leptina, independente da etiologia, está fortemente relacionado com o desenvolvimento do CM. Diferentes alelos polimórficos estão relacionados com o CM em mulheres em diferentes partes do mundo. Estudos demonstram que, a hiperleptinemia diminui a fosforilação da AMPK, que aumenta a produção da aromatase, e ativa vias como MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT/mTOR e JAK2/STAT3 que estão relacionadas com o aumento da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, migração, invasão e também o aumento da atividade da aromatase no tecido gorduroso.

### c) Adiponectina

A adiponectina é a mais abundante das adipocinas produzidas pelo tecido gorduroso. A sua principal função é aumentar a sensibilidade das células a insulina. A adiponectina exerce um papel antiapoptótico inibindo a proliferação celular e níveis elevados dessa adipocina estão relacionados com redução na incidência de neoplasias, especialmente o CM. Por outro lado, níveis baixos de adiponectina estão relacionados com CM, resistência à insulina, DM2, síndrome metabólica, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares. Pacientes obesos apresentam um estado de hipoadiponectinemia e aumento da resistência à insulina.

Estudos *in vitro* com linhagens celulares de CM demonstraram que a adiponectina é capaz de inibir a expressão da aromatase no adipócito. Em situações de baixos níveis de adiponectina ocorre uma diminuição da ativação

da sinalização do receptor nuclear de adipócitos - o PPAR-gama - e uma subsequente diminuição dos níveis nucleares do BRCA1 e alterações nos mecanismos de reparo do DNA celular.

Além disso, essa adipocina estimula a via intracelular da AMPK com um efeito inibitório nos ciclos de divisão celular, regula a apoptose celular, inibição da angiogênese e de fatores de crescimento pela supressão da via mTOR e ativa a via do PPAR-gama que auxilia na regulação na proliferação e na diferenciação celular. A hipoadiponectinemia propicia um estado de resistência à insulina e uma redução de todos os aspectos positivos que envolvem a ação adiponectina e um melhor controle do ciclo celular.

#### d) Outras adipocinas

Além da relação inversamente e diretamente proporcional do CM com a adiponectina e a leptina, respectivamente, outras adipocinas parecem não ter um papel fisiopatológico tão importante no desenvolvimento desta neoplasia. Apesar da relação com o aumento da resistina com o desenvolvimento de resistência à insulina, estudos prévios não demonstraram uma relação do aumento nos níveis desta adipocina com o CM. Porém, pesquisa recente *in vitro* demonstrou que, o aumento da resistina era capaz de aumentar a expressão de alguns genes como *PROM1*, *PTPRC*, *KLF17*, *SIRT1* e *PECAM1*, aumentando a inflamação no epitélio mesenquimal de transição da glândula mamária com grande potencial de metástases.

#### e) Citocinas inflamatórias

O tecido adiposo do paciente obeso tem um grande potencial inflamatório. Além das adipocinas alteradas em indivíduos que estão acima do peso ditas anteriormente, o tecido adiposo de paciente obesos secretam diversas citocinas pró inflamatórias o que determina um estágio inflamatório subagudo nesta situação. As principais citocinas produzidas em adipócitos de indivíduos obesos são as interleucinas (IL-1beta e IL-6), TNF-alfa, prostaglandina (PGE2) e monocyte chemotatic protein 1 (MCP1) que ativam a transcrição da NFkB, inclusive no tecido mamário. A obesidade, o estado de hipóxia crônica associada e a ativação do *toll-like* receptor 4 (TLR4) por uma dieta hiperlipídica apresentam um maior recrutamento de macrófagos no tecido adiposo, maior secreção de interleucinas, PGE2 e TNF-alfa e, via JAK1/SAT3, aumentam a expressão da aromatase.

#### **Melatonina, distúrbios metabólicos e CM**

Entre as diversas causas da obesidade, uma das prováveis etiologias relacionadas é a diminuição nos níveis de melatonina. A melatonina é um hormônio indolaminérgico produzido pela glândula pineal, derivado do triptofano, estimulada pela ausência da luz e uma forte relação com o ciclo circadiano. Pacientes que trabalham em turnos durante a noite ou que tem menor duração de tempo de sono apresentam menor produção de melatonina e maior risco de desenvolvimento de obesidade. O menor tempo de atividade física e o maior tempo em frente a aparelhos que emitem iluminação artificial

com ondas de luz azul (que inibem mais a produção da melatonina) estão relacionados com o aumento do peso.

Menores níveis de melatonina está relacionada com aumento do apetite, alterações metabólicas e maior chance de desenvolvimento de complicações como DM2 e hipertensão arterial. Polimorfismos no gene no receptor de melatonina - o *MTNR1B* - também estão relacionados com o surgimento do DM2. Mulheres que invertem o ciclo circadiano, além de problemas metabólicos já relatados, também apresentam maior risco de desenvolverem CM. O risco de CM aumenta com o tempo de exposição a luz artificial durante o período noturno em trabalhadores de turnos, com uma estimativa de 16% de aumento a cada 10 anos. Baseado nisso, a National Board of Industrial Injuries, na Dinamarca, reconhece o CM como uma doença ocupacional em mulheres que trabalham em períodos noturnos pelo menos uma vez por semana por 20 anos ou mais. Mulheres com CM/ER+ apresentam níveis séricos noturnos de melatonina significativamente menores quando comparadas com mulheres saudáveis e mulheres com CM/ER-.

Estudos *in vitro* e em modelos animais já demonstraram um potencial antitumoral da melatonina. A reposição deste hormônio já se mostrou efetiva por inibir a angiogênese através da redução do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Além disso, a melatonina reduz fatores relacionados com a invasão celular, diminuindo o risco de metástase, reduz a proliferação celular e tem uma propriedade anti-inflamatória com decréscimo dos níveis de citoninas, como o TNF-alfa. Estudos *in vitro* também comprovaram que a melatonina tem um efeito antiestrogênico. Além de

aumentar a expressão e a atividade da estrogênio sulfatransferase, que inativa o estrogênio, a melatonina ao se ligar nos seus receptores MT1 e MT2 em linhagens neoplásicas de CM, promovem um *downregulation* no ER, diminuindo a ligação do estrogênio com o seu receptor e também uma redução na expressão da aromatase.

Além de ser uma substância sem efeitos colaterais, o uso da melatonina poderia trazer outros benefícios como melhora da qualidade do sono, redução dos efeitos colaterais relacionados ao uso de algumas quimioterapias e medicações adjuvantes, como redução do risco de trombozes e osteoporose. Enquanto o benefício do uso de melatonina em mulheres que trabalham a noite, afim de prevenir o risco de CM, continua sem inconsistente, trabalhos demonstram resultados satisfatórios em pacientes vítimas de intoxicação por cádmio, um xenoestrogênio de grande potencial carcinogênico, na prevenção do risco de CM. O cádmio tem uma grande capacidade de aumentar a proliferação de CM/ER+, bem como aumentar a expressão de genes regulados pelo estrogênio e aumento da sinalização de vias como a ERK 1/2 e a AKT. Além de reduzir o estresse oxidativo, o uso exógeno de melatonina impede a ligação do cádmio ao ER. O uso de melatonina em camundongos foi capaz de prevenir o efeito estrogênico do cádmio na glândula mamária e no útero. Estudos também tentam demonstrar o benefício do uso exógeno de melatonina como medicação antiobesidade. Direta e indiretamente, o uso da melatonina em mulheres obesas poderia reduzir o risco de CM por diminuir a resistência à insulina e aumentar a adiponectina.

## Conclusão

O sobrepeso e a obesidade é um grave problema de saúde público mundial. No Brasil, estima-se que 20% da população apresente IMC de obesidade e metade esteja acima do peso. Além de ser um importante fator de risco para o surgimento de doenças, como o DM2, o ganho de peso é um fator de risco independente para o desenvolvimento de neoplasias, entre elas o CM. Alterações relacionadas com a fisiopatologia da obesidade, como a redução dos níveis séricos de melatonina, e alterações metabólicas em consequência ao ganho de peso como a resistência à insulina e a leptina (e consequentemente a um estado de hiperinsulinemia e hiperleptinemia), aumento de IGF-I, a hipoadiponectomia e o incremento de citocinas inflamatórias estão intimamente relacionados com distúrbios que propiciam o desenvolvimento do CM, alterações genéticas e moleculares relacionadas a desregulação da divisão celular com aumento da proliferação celular e da angiogênese, consequentemente um maior risco de metástases, diminuem a apoptose, aumentam a presença de ER, o efeito estrogênico sobre a glândula mamária e a expressão da aromatase. Compreender essas vias que estão correlacionadas com a obesidade e o CM são de grande importância para a tomada de decisões relacionadas desde a prevenção da doença até novas opções terapêuticas no CM em pacientes que apresentam sobrepeso e obesidade.

## Referências bibliográficas

Apovian CM, Arrone LJ, Bessesen DH et al. Pharmacological management of obesity: and Endocrine Society clinical practice guideline.

Azrad M, Blair CK, Rock CL et al. Adult weight gain accelerates the onset of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 176(3): 649-656.

Ayoub NM, Yaghan RJ, Abdo NM et al. Impact of obesity on clinicopathologic characteristics and disease prognosis in pre and postmenopausal breast cancer patients: a retrospective institutional study. *J Obesity* 2019; 25;2019.

Barazzoni R, Cappelari GG, Ragni M et al. Insulin resistance in obesity: a overview of fundamental alterations. *Eat Weight Disord* 2018; 32(2): 149-157.

Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 579-591.

Cui H, López M, Rahmouni K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2017; 13(6): 338-351.

Goncalvez MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-Kinase, growth disorders, and cancer. *New Engl J Med* 2018; 379: 2052-2062.

Gurnani M, Birken C, Hamilton J. Childhood obesity: causes, consequences and management. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62(4): 821-840.

Hassinger TE, Mehaffey JH, Hawkins RB et al. Overall and estrogen receptor-positive breast cancer incidences are decreased following bariatric surgery. *Obesity Surg* 2019; 29: 776-781.

Howlader N, Altekruse SF, Li CI et al. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst* 214; 106(5): dju055.

Guo S, Liu M, Wang G et al. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825: 207-222.

Grün F. Obesogens. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 453-459.

Kim JY, DeMenna JT, Puppala S et al. Physical activity and FTO genotype by physical activity interactive influences on obesity. *BMC Genet* 2016; 17:47. doi: 10.1186/s12863-016-0357-6.

Kim JY, Lee DW, Lee KH et al. Prognostic role of body mass index is different according to menopausal status and tumor subtype in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2019; 176: 453-460.

Kranendonk ME, Van Herwaarden JA, Stupkova T et al. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depot relate differently to metabolic risk factors of cardiovascular disease: distinct fat depots and vascular risk factors. *Atherosclerosis* 2015; 239(2): 419-427.

Martinez-Useros J, Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med* 2016; 14:21.

MS - INCA. Ministério da Saúde (MS) e Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2018 - Incidência do Câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2018.

NCR Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based

measurement studies with 19,2 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1377-1396.

Pan K, Luo J, Aragaki AK et al. Weight loss, diet composition and breast cancer incidence and outcome in postmenopausal women. *Oncotarget* 2019; 10(33): 3088-3092.

Puckett M, Neri A, Underwood JM, Stewart S. Nutrition and physical activity strategies for cancer prevention in current national comprehensive cancer control program plans. *Journal of Community Health*, 2016; 41(5): 1013-1020.

Renahan AG, Tyson M, Egger M et al. Body mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008; 371: 569-578.

Simone V, D'Avenia M, Argentiero A et al. Obesity and breast cancer: molecular interconnections and potential clinical applications. *The Oncologist* 2016; 21: 404-417.

Simpson ER, Brown KA. Obesity and breast cancer: role of inflammation and aromatase. *J Mol Endocrinol* 2013; 51: T51-T59.

Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M et al. Cancer-immune interactions in Er-positive breast cancer: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res* 2019; 21:90.

VIGITEL Brasil 2016. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito por telefone: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de

Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção de Saúde - Brasília; Ministério da Saúde, 2017.

Zhang J, Wang Q, Wang Q et al. Mechanisms of resistance to estrogen receptor modulators in ER+/HER2- advanced breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 559-572.

Zhang M, Zhang X, Liu J et al. Body mass index and diabetes are important prognostic signatures for bilateral breast cancer prognosis. *J Cell Biochem* 2019; doi: 10.1002/jcb.28011.

## **ANEXO I**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: MARCADORES TUMORAIS EM BIÓPSIA LÍQUIDA - ESTUDO DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA POR BLOQUEIO DO REPARO DE DNA – ANÁLISE COMPARATIVA

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC / Prof. Newton Antônio Bordin Junior – Oncologista - Responsável pela Unidade de Mastologia e Oncologia Ginecológica do Hospital de Base / Centro Integrado de Pesquisa HB / FAMERP / FUNFARME (CIP)

- Para obter maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama e resposta à tratamentos específicos, os pesquisadores da FAMERP de São José do Rio Preto (SP) estão desenvolvendo uma pesquisa científica que poderá melhorar o nosso conhecimento sobre esse tumor e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnósticos e de melhora na qualidade de vida;
- Para isso, uma amostra de sangue e dois fragmentos do tumor serão coletados e enviados ao laboratório para as análises;

· Se eu concordar que uma pequena quantidade de sangue e dois fragmentos do tumor sejam retirados e utilizados para a pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes dela.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pela pesquisadora sobre a utilização para estudo de uma amostra de sangue (10 mL) e dois fragmentos de tumor, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido (a) a qualquer tipo de pressão:

Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome do (a) participante:

Representante legal:

Prontuário médico:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelos endereços abaixo indicados.

Nome do (a) pesquisador:

Data:...../...../...../ Assinatura:.....

Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari – Docente do Departamento de Biologia Molecular e coordenadora do LIMC

Av. Brigadeiro Faria Lima, no. 5416

FAMERP - Faculdade de Medicina de S.J. Rio Preto São José do Rio Preto, SP  
- CEP 15090-000

Fone: (17) 3201-5885

e-mails: [debora.zuccari@famerp.br](mailto:debora.zuccari@famerp.br)

Em caso de dúvidas contatar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (0xx17) 3201-5700, ramal 5813.

## ANEXO II

### Avaliação da expressão gênica

Neste anexo se encontra a base de dados dos valores obtidos da análise da expressão gênica dos quatro genes avaliados (*CDH1*, *VIM*, *IL17B* e *IL8*) comparando individualmente cada paciente de acordo com o seu IMC (com ou sem obesidade) e seus respectivos grupos controle, empregando as médias dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ( $\Delta\Delta Ct$ ) e o logaritmo de base 10 ( $\log_{10}$ ) do  $\Delta\Delta Ct$ .

O grupo 1 (CM com obesidade) apresenta oito pacientes e o grupo 3 (CM sem obesidade) apresenta nove pacientes. As análises que não tiveram expressão gênica está representada pela letra "X". Foi feito um *pool* das amostras para avaliar o valor da expressão gênica dos grupos controle com e sem obesidade (grupo 2 e grupo 4, respectivamente) e todas as amostras foram feitas em duplicata.

| Amostras     | CT CDH1          | Média CT Endógenos | Log10            | CT VIM           | Média CT Endógenos | Log10            | CT IL17B         | Média CT Endógenos | Log10            | CT IL8           | Média CT Endógenos | Log 10           |
|--------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Pool grupo 2 | 28,972<br>28,790 | 30,882<br>30,843   | -0,021<br>0,021  | 27,053<br>27,129 | 30,882<br>30,843   | 0,017<br>-0,017  | 29,958<br>30,005 | 30,882<br>30,843   | 0,013<br>-0,013  | 32,883<br>33,221 | 30,882<br>30,843   | 0,060<br>-0,060  |
| Média CT     | 28,881           | 30,862             | 0,000            | 27,081           | 30,862             | 0,000            | 29,982           | 30,862             | 0,000            | 33,042           | 30,862             | 0,000            |
| Grupo 1      |                  |                    |                  |                  |                    |                  |                  |                    |                  |                  |                    |                  |
| 1            | 26,471<br>26,563 | 30,577<br>30,857   | 0,639<br>0,663   | 26,022<br>26,956 | 30,577<br>30,746   | 0,236<br>0,307   | 28,171<br>28,347 | 30,577<br>30,746   | 0,459<br>0,457   | 32,605<br>62,623 | 30,577<br>30,746   | 0,045<br>0,091   |
| Média CT     | 26,517           | 30,661             | 0,651            | 25,989           | 30,661             | 0,271            | 28,259           | 30,661             | 0,458            | 32,614           | 30,661             | 0,068            |
| 2            | 27,279<br>27,162 | 30,621<br>30,304   | 0,410<br>0,349   | 27,090<br>26,995 | 30,621<br>30,304   | -0,072<br>-0,139 | 33,164<br>24,673 | 30,621<br>30,304   | -1,031<br>-1,580 | 31,481<br>31,343 | 30,621<br>30,304   | 0,397<br>0,343   |
| Média CT     | 27,221           | 30,463             | 0,379            | 27,042           | 30,463             | -0,106           | 33,919           | 30,463             | -1,306           | 31,412           | 30,463             | 0,370            |
| 3            | 22,156<br>22,136 | 30,727<br>30,777   | 1,983<br>2,005   | 24,355<br>24,451 | 30,727<br>30,777   | 0,783<br>0,789   | 27,947<br>28,438 | 30,727<br>30,777   | 0,572<br>0,439   | 32,522<br>32,469 | 30,727<br>30,777   | 0,116<br>0,147   |
| Média CT     | 22,146           | 30,752             | 1,994            | 24,421           | 30,752             | 0,776            | 28,438           | 30,752             | 0,505            | 32,489           | 30,752             | 0,131            |
| 4            | 24,894<br>24,980 | 30,091<br>30,165   | 0,968<br>0,964   | 26,896<br>26,759 | 30,091<br>30,165   | -0,173<br>-0,110 | 35,938<br>26,821 | 30,091<br>30,165   | -2,025<br>-2,269 | 29,902<br>29,719 | 30,091<br>30,165   | 0,713<br>0,760   |
| Média CT     | 24,937           | 30,128             | 0,966            | 26,827           | 30,128             | -0,142           | 36,380           | 30,128             | -2,147           | 29,810           | 30,128             | 0,752            |
| 5            | 26,607<br>26,809 | 26,442<br>26,735   | -0,648<br>-0,619 | 23,253<br>23,390 | 26,442<br>26,735   | -0,175<br>-0,128 | 37,109<br>34,853 | 26,442<br>26,735   | -3,478<br>-2,709 | 31,589<br>31,486 | 26,442<br>26,735   | -0,887<br>-0,774 |
| Média CT     | 26,708           | 26,588             | -0,633           | 23,322           | 26,588             | -0,152           | 35,981           | 26,588             | -3,093           | 31,527           | 26,588             | -0,831           |
| 6            | 26,402<br>26,409 | 28,356<br>28,197   | -0,008<br>-0,058 | 24,670<br>24,748 | 28,356<br>28,197   | -0,026<br>-0,097 | 35,731<br>35,942 | 28,356<br>28,197   | -2,485<br>-2,596 | 29,621<br>29,553 | 28,356<br>28,197   | 0,275<br>0,248   |
| Média CT     | 26,405           | 28,276             | -0,033           | 24,709           | 28,276             | -0,061           | 35,838           | 28,276             | -2,541           | 29,587           | 28,276             | 0,262            |
| 7            | 22,235<br>22,847 | 32,805<br>32,843   | 2,585<br>2,413   | 25,901<br>25,957 | 32,805<br>32,868   | 0,943<br>0,937   | 31,980<br>31,814 | 32,805<br>32,843   | -0,011<br>0,045  | 29,870<br>30,181 | 32,805<br>32,843   | 1,540<br>1,457   |
| Média CT     | 22,541           | 32,824             | 2,499            | 25,929           | 32,824             | 0,940            | 31,887           | 32,824             | 0,017            | 30,026           | 32,824             | 1,498            |
| 8            | 34,588<br>34,457 | 32,435<br>33,351   | -1,245<br>-0,930 | 27,788<br>27,799 | 32,435<br>33,351   | 0,284<br>0,536   | X<br>X           | 32,435<br>33,351   | X<br>X           | 35,859<br>37,108 | 32,435<br>33,351   | -0,315<br>-0,475 |
| Média CT     | 34,523           | 32,893             | -1,087           | 27,793           | 32,893             | 0,400            | X                | 32,893             | X                | 36,384           | 32,893             | -0,395           |

Dados da expressão gênica das pacientes do grupo 1 em comparação com o pool de pacientes do grupo 2

| Amostras     | CT CDH1          | Média CT Endógenos | Log10            | CT VIM           | Média CT Endógenos | Log10            | CT IL17B         | Média CT Endógenos | Log10            | CT IL8           | Média CT Endógenos | Log10            |
|--------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Pool grupo 4 | 26,759<br>26,737 | 28,543<br>28,566   | -0,007<br>0,007  | 24,014<br>24,040 | 28,543<br>28,566   | 0,000<br>0,000   | 28,515<br>28,554 | 28,543<br>28,566   | 0,002<br>-0,002  | 30,741<br>30,505 | 28,543<br>28,566   | -0,039<br>0,039  |
| Média CT     | 26,748           | 28,555             | 0,000            | 24,027           | 28,555             | 0,000            | 28,535           | 28,555             | 0,000            | 30,623           | 28,555             | 0,000            |
| Grupo 3      |                  |                    |                  |                  |                    |                  |                  |                    |                  |                  |                    |                  |
| 1            | 29,828<br>29,917 | 31,395<br>31,453   | -0,072<br>-0,082 | 26,639<br>26,800 | 31,395<br>31,453   | 0,069<br>0,038   | 36,775<br>36,775 | 31,395<br>31,453   | -1,626<br>-1,608 | 31,154<br>30,899 | 31,395<br>31,453   | 0,695<br>0,789   |
| Média CT     | 29,873           | 31,424             | -0,077           | 26,720           | 31,424             | 0,053            | 36,775           | 31,424             | -1,617           | 31,026           | 31,424             | 0,742            |
| 2            | 29,811<br>29,818 | 28,890<br>28,878   | -0,821<br>-0,827 | 25,650<br>25,846 | 28,890<br>28,878   | -0,387<br>-0,450 | 36,190<br>34,630 | 28,890<br>28,878   | -2,203<br>-1,738 | 30,714<br>30,541 | 28,890<br>28,878   | 0,074<br>0,122   |
| Média CT     | 29,815           | 28,884             | -0,824           | 25,748           | 28,884             | -0,419           | 35,410           | 28,884             | -1,971           | 30,627           | 28,884             | 0,098            |
| 3            | 31,614<br>32,031 | 34,277<br>34,420   | 0,258<br>0,175   | 30,017<br>30,251 | 34,277<br>34,420   | -0,080<br>-0,108 | X<br>X           | 34,277<br>34,420   | X<br>X           | 35,580<br>36,770 | 34,277<br>34,420   | 0,230<br>-0,085  |
| Média CT     | 31,822           | 34,349             | 0,217            | 30,134           | 34,349             | -0,094           | X                | 34,349             | X                | 36,176           | 34,349             | 0,073            |
| 4            | 21,385<br>21,304 | 26,578<br>26,739   | 1,019<br>1,092   | 23,189<br>23,310 | 26,578<br>26,739   | -0,343<br>-0,331 | 32,588<br>32,830 | 26,578<br>26,739   | -1,815<br>-1,840 | 28,857<br>28,983 | 26,578<br>26,739   | -0,069<br>-0,053 |
| Média CT     | 31,345           | 28,658             | 1,056            | 23,249           | 26,658             | -0,337           | 32,709           | 26,658             | -1,827           | 28,929           | 26,658             | -0,061           |
| 5            | 24,467<br>24,523 | 30,944<br>30,870   | 1,406<br>1,367   | 23,858<br>23,950 | 30,944<br>30,870   | 0,770<br>0,720   | 29,615<br>29,543 | 30,944<br>30,870   | 0,394<br>0,394   | 32,741<br>32,203 | 30,944<br>30,870   | 0,082<br>0,221   |
| Média CT     | 24,495           | 30,907             | 1,386            | 23,904           | 30,907             | 0,745            | 29,579           | 30,907             | 0,394            | 32,427           | 30,907             | 0,152            |
| 6            | 27,818<br>27,828 | 33,321<br>33,063   | 1,113<br>1,032   | 26,923<br>26,935 | 33,321<br>33,063   | 0,563<br>0,482   | 32,205<br>33,330 | 33,321<br>33,063   | 0,330<br>-0,086  | 34,825<br>34,862 | 33,321<br>33,063   | 0,170<br>0,081   |
| Média CT     | 27,823           | 33,192             | 1,072            | 26,929           | 33,192             | 0,522            | 32,767           | 33,192             | 0,122            | 34,843           | 33,192             | 0,126            |
| 7            | 25,269<br>25,374 | 27,341<br>27,639   | 0,080<br>0,138   | 24,244<br>24,180 | 27,341<br>27,639   | -0,431<br>-0,322 | 28,976<br>28,928 | 27,341<br>27,639   | -0,498<br>-0,394 | 33,008<br>33,001 | 27,341<br>27,639   | -1,083<br>-0,992 |
| Média CT     | 25,322           | 27,490             | 0,109            | 24,212           | 27,490             | -0,376           | 28,952           | 27,490             | -0,446           | 33,005           | 27,490             | -1,037           |
| 8            | 26,124<br>26,380 | 33,035<br>33,169   | 1,537<br>1,500   | 28,571<br>28,649 | 33,035<br>33,169   | -0,079<br>-0,002 | 32,644<br>33,004 | 33,035<br>33,169   | 0,112<br>0,044   | X<br>X           | 33,035<br>33,169   | X<br>X           |
| Média CT     | 26,252           | 33,102             | 1,518            | 28,610           | 33,102             | -0,011           | 32,824           | 33,102             | 0,078            | X                | 33,102             | X                |
| 9            | 22,212<br>22,239 | 27,679<br>27,536   | 1,102<br>1,051   | 24,740<br>24,977 | 27,679<br>27,536   | -0,478<br>-0,593 | 33,368<br>32,902 | 27,679<br>27,536   | -1,718<br>-1,621 | 32,495<br>33,237 | 27,679<br>27,536   | -0,827<br>-1,094 |
| Média CT     | 22,226           | 27,607             | 1,0762           | 24,859           | 27,607             | -0,535           | 33,130           | 27,607             | -1,669           | 32,866           | 27,607             | -0,960           |

Dados da expressão gênica das pacientes do grupo 3 em comparação com o pool de pacientes do grupo 4