



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

DANIEL DE SIQUEIRA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO
MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Recife
2022

DANIEL DE SIQUEIRA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO
MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientadora: Prof.^a Dra. Angela Castoldi de Albuquerque

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Carvalho, Daniel de Siqueira.

Avaliação da expressão de genes do metabolismo lipídico no microambiente tumoral e sua correlação prognóstica em pacientes com câncer de mama. / Daniel de Siqueira Carvalho. – 2022.

47 f.

Orientadora: Angela Castoldi de Albuquerque.

Coorientador: Fabrício Oliveira Souto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à Saúde, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Euphorbiaceae. 2. Compostos Fenólicos. 3. Úlceras gástricas. I. Albuquerque, Angela Castoldi de. (orient.). II. Souto, Fabrício Oliveira. III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-309

DANIEL DE SIQUEIRA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO
MICROAMBIENTE TUMORAL E SUA CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA EM
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia aplicada à Saúde

.

Aprovado em: 29/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Angela Castoldi de Albuquerque (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Vinícius de Andrade Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal do ABC - UFABC

RESUMO

O câncer de mama é a doença neoplásica mais incidente em mulheres no mundo e no Brasil. O microambiente tumoral, constituído pelas células neoplásicas, não-neoplásicas e matriz extracelular adjacente, apresenta grande importância na progressão e resistência ao tratamento do câncer ao fornecer um ambiente propício para o desenvolvimento tumoral. O metabolismo lipídico é de suma importância nesse contexto por ser utilizado pelas células tumorais para produção de energia, estruturas e produtos essenciais na multiplicação, resiliência e disseminação celular. Em contrapartida, células imunes inseridas no mesmo microambiente também são dependentes de lipídios para diversas funções, com efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, a depender da estimulação recebida. Apesar dos avanços científicos recentes, existem ainda muitas lacunas a respeito destes mecanismos para que possam ser explorados como sinalizadores de prognóstico, risco elevado de progressão ou até mesmo para fins terapêuticos. Este estudo analisou amostras de câncer de mama de pacientes submetidas à cirurgia, realizando a extração de RNA dos fragmentos tumorais para avaliar por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) a expressão dos genes CD36, Acil-CoA desidrogenase de cadeia longa (ACADL), Glicerol-3-fosfato aciltransferase 4 (GPAT4) e carnitina palmitoiltransferase 1a (CPT1a), envolvidos no metabolismo lipídico de células tumorais e imunes, além de Arginase 1 (ARG1) expresso por macrófagos associados ao tumor (TAMs). Avaliamos a correlação da expressão desses genes com os diferentes estágios e subtipos tumorais. Além disso, estudamos por meio de banco de dados as diferenças na dependência do metabolismo lipídico entre TAMs e macrófagos glandulares em um modelo murino de câncer de mama com expressão do receptor do fator de crescimento epitelial humano 2 (HER2). Observamos queda nos níveis de expressão relativa de ACADL nas portadoras de câncer de mama, enquanto GPAT4 e CPT1a encontraram-se elevados significativamente, mostrando uma associação importante entre o metabolismo lipídico e uma atividade imune permissiva ao desenvolvimento tumoral. Adicionalmente, o GPAT4 associa-se positivamente aos tumores HER2, apesar de inversamente proporcional à sua progressão. Também constatamos que o perfil lipídico dos TAMs em modelo murino de câncer de mama também apresenta alterações importantes comparados aos macrófagos glandulares, de maneira própria, com a diminuição de CD36, por exemplo. Como desfecho, pudemos ampliar o

conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral, que envolve vias do metabolismo lipídico no microambiente tumoral, tanto em células tumorais como em TAMs.

Palavras-chave: câncer de mama; microambiente tumoral; perfil lipídico.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplastic disease in women worldwide and in Brazil. The tumor microenvironment, constituted by neoplastic and non-neoplastic cells and adjacent extracellular matrix, is of great importance in cancer progression and resistance to treatment by providing a favorable environment for its development through tumor-released mediators. The lipid metabolic pathway is of paramount importance in this context because it is used by tumor cells to bring out energy, structures and other products essential in the multiplication, resilience and dissemination of tumor cells. On the other hand, immune cells inserted in the same microenvironment are also dependent on lipids for several functions, with either pro-inflammatory or reparative effects, depending on the received stimuli. Despite recent scientific advances, there are still many gaps regarding these mechanisms so that they can be explored as progression or prognostic indicators, or even for therapeutic purposes. This study analysed breast cancer samples from patients submitted to surgery, performing RNA extraction from tumor fragments to evaluate, by means of qRT-PCR the expression of CD36, Acyl-CoA dehydrogenase long chain (ACADL), glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 (GPAT4), carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) and arginase 1 (ARG1) genes, involved in the lipid metabolism of tumor and immune cells, and their correlation with the different stages and tumor subtypes. Additionally, we also studied the reliance on lipid metabolism of TAMs compared to glandular macrophages in a human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive breast cancer murine model. We observed a decrease in the levels of relative expression of ACADL in women with breast cancer, while GPAT4 and CPT1a were significantly elevated, showing a previously undisclosed association between lipid metabolism and an immunity that is permissive to tumor development. Additionally, GPAT4 is positively associated with HER2 tumors, despite being inversely proportional to their progression. We also found that the lipid profile of TAMs in the murine model also shows changes compared to glandular macrophages, albeit in a different manner, such as the downregulation of CD36. As an outcome, we were able to expand the knowledge about the mechanisms involved in tumor progression, which involves lipid metabolism pathways in the tumor microenvironment, in both tumor cells and in TAMs.

Keywords: breast cancer; tumor microenvironment; lipid profile.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	10
1.1.1	Objetivo geral	10
1.1.2	Objetivos específicos	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	CÂNCER DE MAMA	11
2.1.1	Epidemiologia	11
2.1.2	Rastreio e diagnóstico	15
2.1.3	Patologia e estadiamento	16
2.1.4	Tratamento	19
2.2	MICROAMBIENTE TUMORAL	19
2.2.1	Macrófagos associados ao tumor	20
2.3	METABOLISMO LIPÍDICO NO CÂNCER	20
2.3.1	Metabolismo lipídico dos TAM	22
2.4	CD36	23
2.5	GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASE 4	24
2.6	ACIL-COA DESIDROGENASE DE CADEIA LONGA	24
2.7	CARNITINA PALMITOIL TRANSFERASE 1A	24
2.8	ARGINASE 1	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	DESENHO DO ESTUDO	26
3.2	AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS	26
3.3	CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DE PACIENTES	26
3.4	EXTRAÇÃO DO RNA TECIDUAL	27
3.5	SÍNTESE DO CDNA	27
3.6	QRT-PCR	27
3.7	MÉTODO DE ANÁLISE DOS DADOS	28
3.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	EXPRESSÃO GÊNICA NO CA DE MAMA	30
4.2	EXPRESSÃO DE GENES EM MODELO MURINO	34

5	CONCLUSÃO	37
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A – CD8+ T CELL METABOLIC CHANGES IN BREAST CANCER	44
	ANEXO A – PARECER E APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO	45

1 INTRODUÇÃO

O câncer (CA) é um dos maiores problemas de saúde da sociedade atual, sendo estimados mais de 19 milhões de novos casos diagnosticados em 2020 e quase 10 milhões de óbitos para o mesmo período, globalmente. Dos inúmeros tipos de câncer, o mais prevalente em mulheres é o câncer de mama. No Brasil, o envelhecimento populacional contribui para o aumento progressivo do já elevado número de casos, bem como óbitos. Pernambuco, situado na região nordeste do país, contribuiu com taxas de incidência e mortalidade acima das médias nacional e mundial (INCA, 2020).

O rastreio da neoplasia de mama é realizado por meio da mamografia em pacientes de meia-idade (MIGOWSKI et al., 2018). Apesar dos esforços governamentais, ainda há um déficit na oferta de exames necessários para a cobertura adequada da população brasileira, com uma proporção de 27,2% dessa faixa etária sem mamografia nos últimos dois anos em 2021.

Atrasos no rastreio e diagnóstico levam a maior proporção de estágios avançados ao diagnóstico, onde nos últimos vinte anos, a proporção de casos detectados em estágios III e IV manteve-se estável, correspondendo a aproximadamente 40% do total. Tal retardo diagnóstico traz um pior prognóstico e a necessidade de medidas terapêuticas progressivamente mais complexas e custosas, de difícil disponibilidade no sistema de saúde público. A sobrevida em 5 anos é de 99% na doença localizada, comparada com 86% em doença regional e 30% na doença disseminada (NIH, 2022).

Estudos buscam marcadores tumorais que possam oferecer dados quanto ao prognóstico, susceptibilidade a determinadas terapias ou pacientes sob maior risco de progressão da doença (DESHPANDE et al., 1999) para um uso mais racional e eficaz dos tratamentos, bem como a priorização de doentes com subtipos mais agressivos.

Nesse contexto, um recente tema de estudo tem sido o microambiente tumoral, que é definido pelo conjunto que engloba não apenas células tumorais, mas também estromais, como fibroblastos, células endoteliais e imunes, além de toda a matriz extracelular subjacente. O tumor é capaz de estimular por diversos mecanismos esses agentes para o auxílio da progressão tumoral e resistência terapêutica por meio da angiogênese, inibição da apoptose e bloqueio do reconhecimento imune, entre outros meios (BAGHBAN et al., 2020).

O metabolismo lipídico é de fundamental importância para todas funções celulares, na formação e manutenção da membrana celular, metabolismo energético e síntese de proteínas e outros produtos. Devido ao elevado metabolismo das células cancerígenas a maior intensidade de tais processos demanda uma quantidade ainda maior de substrato, o que culmina na desregulação da lipogênese para suprir tal demanda. Ao contrário da captação exógena de lipídios habitual nas células normais, as cancerígenas apresentam um estímulo à produção interna, favorecida pela glicólise aeróbia e hiper regulação da glutamina. A produção aumentada de lipídios no microambiente tumoral está diretamente relacionada à progressão da doença por meio da proliferação e diferenciação celular, metastatização, resistência terapêutica e mecanismos imunossupressores (LE et al., 2021).

Tal via, devido à sua grande importância biológica, tem sido estudada na busca de possíveis alvos terapêuticos no combate ao câncer. Entretanto, apesar dos recentes avanços, ainda existem muitas lacunas na compreensão da síntese, armazenamento, transporte e uso dos lipídios a se elucidar.

Este estudo busca, através da análise de genes participantes nesses mecanismos, corroborar a hipótese vigente de que estes meios são explorados pelas células cancerígenas no desenvolvimento tumoral.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar o perfil lipídico do microambiente tumoral do CA de mama.

1.1.2 Objetivos específicos

Identificar a expressão dos genes CD36, ACADL, GPAT4, CPT1A e ARG1 em amostras de tecido neoplásico mamário de diferentes estágios e subtipos.

Correlacionar a expressão genética de genes do metabolismo lipídico no microambiente tumoral com os diferentes estágios e subtipos de câncer de mama.

Avaliar a expressão de genes homólogos de captação, síntese, acúmulo e degradação de lipídeos em macrófagos associados ao tumor mamário em modelo murino utilizando dados publicamente disponíveis na plataforma NCBI GEO DataSets.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

2.1.1 Epidemiologia

O câncer de mama é, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, a doença neoplásica mais incidente no sexo feminino no mundo, despontando como câncer mais comum em 160 países (Figura 1), igualmente responsável pela maior parcela de óbitos oncológicos femininos em 113 países (Figura 2).

Figura 1 - Incidência do Câncer de Mama (Ranking), 2020 (exc. CPNM)



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

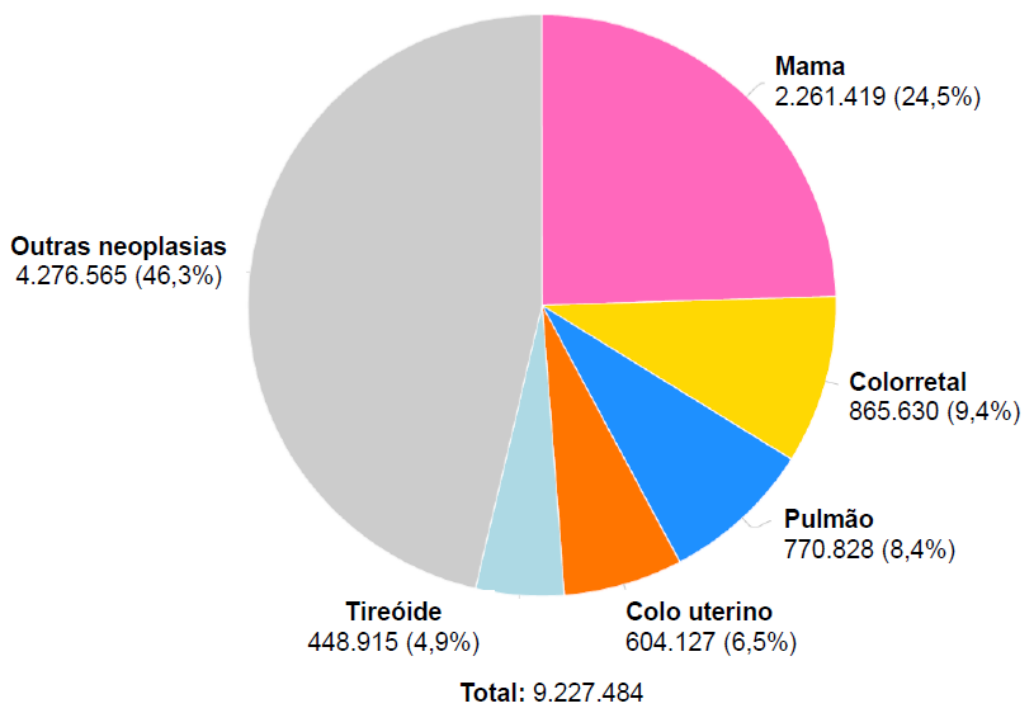
Figura 2 - Mortalidade do Câncer de Mama (Ranking), 2020 (exc. CPNM)



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

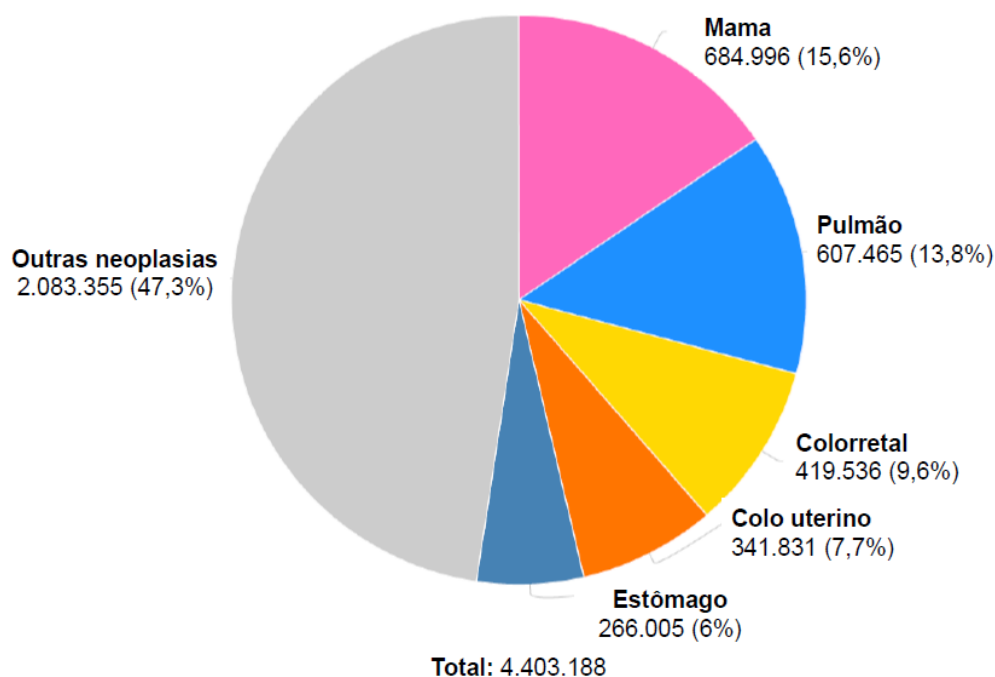
Sob outra perspectiva, a doença foi responsável por um total estimado de 2.261.419 novos casos no ano de 2020 (Figura 3) e contribuiu com 684.996 óbitos globais no mesmo período (Figura 4).

Figura 3 - Estimativa de novos casos de câncer em mulheres, 2020 (exc. CPNM)



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

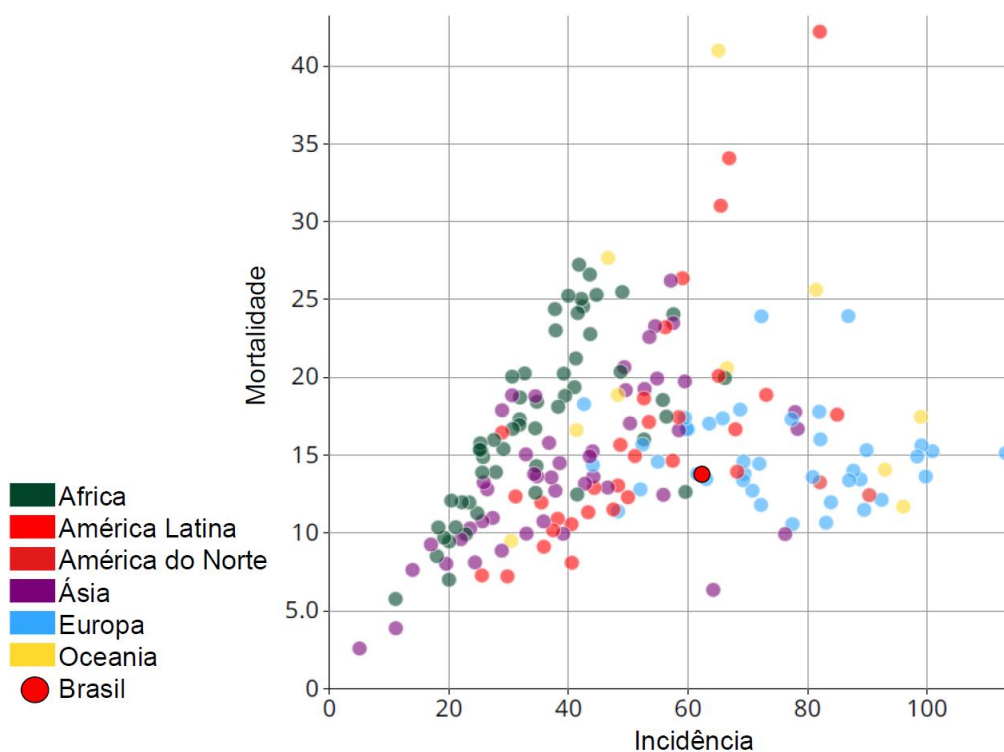
Figura 4 - Estimativa de óbitos de câncer em mulheres, 2020 (exc. CPNM)



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

Outro dado interessante é a relação entre incidência e mortalidade na comunidade internacional. Países desenvolvidos tendem a apresentar uma maior prevalência devido a maior idade populacional, porém a melhor assistência à saúde reduz o número de óbitos. Em contrapartida, países em desenvolvimento apresentam menor mortalidade por possuírem uma população mais jovem, ao passo que a mortalidade elevada nesses locais é um reflexo das condições de saúde inadequadas (Figura 5). Na figura 5 também é possível observar o Brasil em uma posição intermediária, reflexo da sociedade em envelhecimento e engrandecimento econômico nas últimas décadas.

Figura 5 - Mortalidade por Incidência (países) por câncer de mama, 2020



Fonte: Adaptado de GLOBOCAN (2020).

O Brasil segue a tendência mundial ao apresentar o câncer de mama como o mais incidente no sexo feminino. Em termos absolutos nosso país é o 5º maior em número de casos e 6º em óbitos, porém ao observarmos as taxas de incidência e mortalidade ocupamos o 52º e 109º lugar, respectivamente. Nacionalmente, a neoplasia mamária superou inclusive o câncer de próstata em número absoluto de casos na população geral brasileira no ano de 2020 (Figura 6).

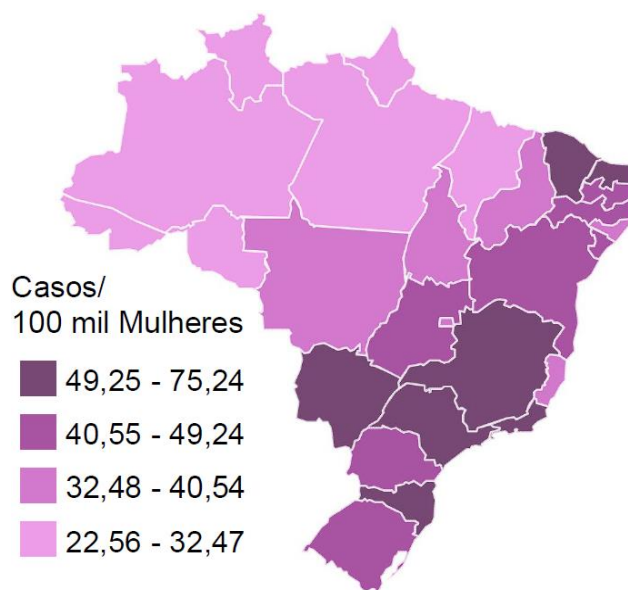
Figura 6 - Distribuição proporcional estimada das neoplasias mais incidentes no Brasil por sexo, para 2020 (exceto CPNM)

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

Fonte: Adaptado de INCA (2020).

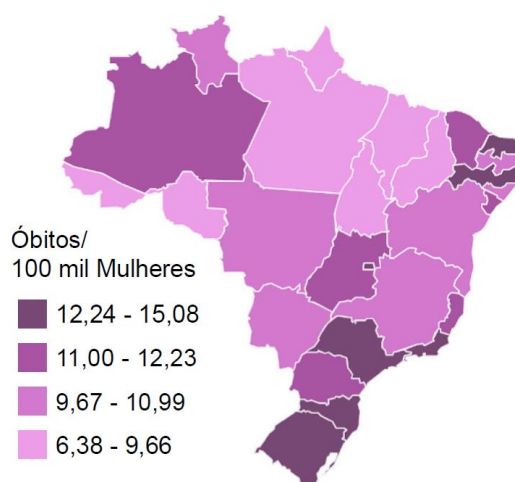
A distribuição nacional dos casos, porém, é bastante heterogênea, reflexo das importantes diferenças econômicas e sociais nas diversas regiões do país. A taxa de incidência tende a ser mais elevada no Sul e Sudeste do país, onde a população apresenta maior idade média e elevada urbanização e industrialização (Figura 7). Já o índice de mortalidade apresenta-se mais distribuído, com diferença importante em alguns estados do Norte e Nordeste, relacionada à menor disponibilidade de assistência à saúde e piores indicadores socioeconômicos (Figura 8).

Figura 7 - Taxa de Incidência do Câncer de Mama por estado



Fonte: Adaptado de INCA (2020).

Figura 8 - Taxa de Mortalidade do Câncer de Mama por estado

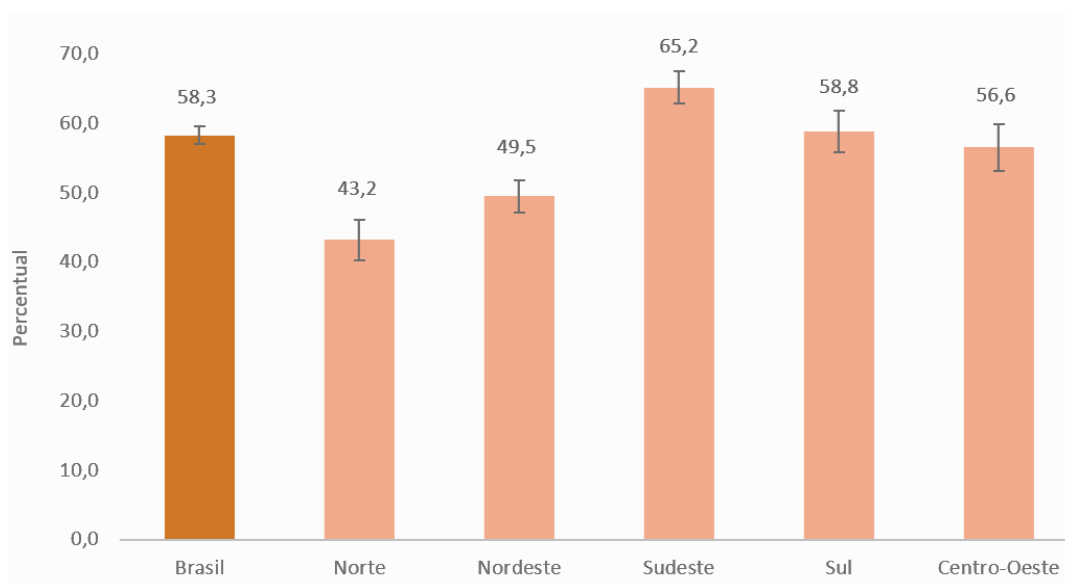


Fonte: Adaptado de INCA (2020).

2.1.2 Rastreio e Diagnóstico

O rastreio do câncer de mama no Brasil é estabelecido de maneira geral pela realização de mamografia a cada dois anos na população feminina entre 50 e 69 anos, por oferecer o melhor equilíbrio entre um diagnóstico precoce e os riscos relacionados ao exame (MIGOWSKI *et al.*, 2018). Infelizmente ainda não há uma cobertura universal e acessível para o público-alvo, de modo que apenas pouco mais de 50% realizam o exame na periodicidade estipulada (Figura 9), culminando em uma maior proporção de estágios avançados ao diagnóstico.

Figura 9 - Percentual de mulheres entre 50 e 69 anos com mamografia há menos de 2 anos, 2019



Fonte: Adaptado de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2019).

O achado radiológico do exame é categorizado de acordo com o Sistema de Relatório de Dados sobre Imagem da Mama (BI-RADS), criado em 1993 pelo Colégio Americano de Radiologia (ACR) com a finalidade de sistematizar os relatórios mamográficos para estudos e comparações futuras, bem como oferecer uma estimativa da possibilidade de doença maligna (Tabela 1). De acordo com a classificação mantém-se o acompanhamento radiológico com periodicidade igual ou maior ou pode ser indicada uma biópsia do local suspeito, seja por punção ou no próprio ato cirúrgico, quando indicado. Após avaliação cito ou histopatológica do material coletado, é definido o diagnóstico.

Tabela 1 - Classificação BI-RADS e conduta sugerida

<i>Brads</i>	Interpretação	Conduta Médica
0	O exame não foi capaz de avaliar corretamente a mama	Outros exames têm que ser feitos (mamografia de compreensão, ultrassom ou ressonância de mama)
1	Exame normal	Seguir rastreamento com mamografia normalmente
2	Exame normal	Seguir rastreamento com mamografia normalmente
3	Provavelmente normal	Seguir rastreamento com mamografia normalmente ou repetir exame com 6 meses
4A, 4B e 4C	Risco baixo (4A), moderado (4B) e alto (4C) de câncer	Realizar biópsia da mama
5	Risco alto de câncer	Realizar biópsia da mama
6	Paciente já tem câncer comprovado por biópsia e fez mamografia para planejar a cirurgia	Planejamento da cirurgia

Fonte: Adaptado de <https://vidasaudavel.einstein.br/> (acesso em 23/08/22).

2.1.3 Patologia e Estadiamento

Após a confirmação da doença, é imperativo descobrir por imunohistoquímica o perfil molecular do câncer de mama, composto por diversos subtipos de acordo com a expressão de receptores hormonais de estrógeno ou progesterona ou do HER2. (Tabela 1). Tal classificação está intimamente relacionada ao tratamento e expectativa de vida do paciente, com os subtipos luminais associados a melhor prognóstico ao passo que o HER2, e principalmente o TN, ligados à uma menor sobrevida. Habitualmente, quanto maior a expressão de receptores, maior o acervo terapêutico à disposição para o caso; um tumor RE⁺/HER2⁺ é mais facilmente tratado que um RE⁻

/HER2⁺, pela possibilidade de hormonioterapia, que tem como alvo o receptor de estrogênio (LIU *et al.*, 2017).

Tabela 2 - Subtipos moleculares por receptor expressado

Subtipo	RE	RP	HER2
Luminal A	+	+	-
Luminal B	+	- / +	-
HER2	- / +	- / +	+
TN	-	-	-

Fonte: AJCC, Manual de Estadiamento do Câncer, 8ª edição (2018).

Outra classificação patológica pertinente ao câncer de mama é o grau histológico (sistema de classificação SBR), o qual estratifica características morfológicas (formação tubular, pleomorfismo nuclear e mitoses) de favorável a desfavorável.

A classificação oncológica mais conhecida é o TNM, desenvolvida pela União Internacional Contra o Câncer na década de 1940. Ela avalia o crescimento local do tumor primário, sua disseminação linfática e a presença de metástases a distância, com a obtenção de determinados grupos de estágio, sendo o principal método para definição prognóstica e terapêutica (Tabela 2). A partir da edição mais recente, publicada pela AJCC em 2018, pode englobar as classificações molecular e histológica para distinguir o chamado grupo de estágio prognóstico, com maior acuidade na instituição de condutas clínicas.

Tabela 3 - Classificação TNM

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

Fonte: AJCC, Manual de Estadiamento do Câncer, 8ª edição (2018)

2.1.4 Tratamento

O tratamento atual do câncer de mama conta com múltiplas ferramentas, divididas em tratamento local (cirurgia e radioterapia) e sistêmico (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica). Em estágios iniciais (I e II), a conduta habitual é realizar primeiramente a cirurgia (com retirada do tumor por mastectomia parcial ou total), com radioterapia posterior em circunstâncias selecionadas. O uso de terapia hormonal ou biológica também pode ser aplicado de acordo com a presença de receptores hormonais ou HER2, respectivamente. Já em casos moderados (principalmente estágio III), é preferível a quimioterapia neoadjuvante (NAC) para posterior tratamento local com cirurgia e radioterapia. Para o estágio IV, mais avançado, tipicamente são empregadas apenas medidas sistêmicas, com priorização à qualidade de vida e emprego restrito de tratamento local (HENRY, 2020). O prognóstico é cada vez melhor com a descoberta de novas terapias e o melhor acesso ao tratamento, com a sobrevida em 5 anos variando de 99%, para os estádios 1 e 2, até 40% para os estádios 3 e 4 (MAKDISSI *et al.*, 2019).

2.2 MICROAMBIENTE TUMORAL (TME)

O microambiente tumoral é constituído pelo tumor propriamente dito, estroma celular adjacente e a matriz que o permeia. Intimamente influenciado pela secreção tumoral de citocinas, quimiocinas e outros fatores, passa por uma reprogramação que o leva a promover o crescimento e desenvolvimento tumoral. Dentre as várias populações de células não-neoplásicas subvertidas, aquelas da imunidade inata (macrófagos, células NK, neutrófilos etc.) e adaptativa (linfócitos T e B) têm sido implicadas por estudos recentes como preponderantes na formação e manutenção de um meio afável ao desenvolvimento neoplásico, oposto ao papel inflamatório e supressivo esperado (HINSHAW *et al.*, 2019).

Um dos principais mecanismos imputados nesse contexto é o da hipóxia, que ocorre apesar da angiogênese tumoral devido ao fato da mesma resultar em uma vasculatura aberrante e descontínua, além de uma drenagem linfática anormal, com alta pressão intersticial. Tal quadro culmina na persistência e acúmulo dos reguladores pró-tumorais, bem como na ativação de fatores induzidos por hipóxia, com consequente estímulo à transição epitelial-mesenquimal. Adicionalmente, a

produção resultante de ácido láctico diminui o pH local, o que reduz a atividade imune humoral e a resposta terapêutica, contribuindo ainda para a metastatização pelo estímulo à produção de proteases (JING *et al.*, 2019).

No câncer de mama, especificamente, além dos fatores comuns às neoplasias de outros sítios primários, um aspecto único é a relação entre as células neoplásicas e os adipócitos, com grande importância para a progressão tumoral (HOUTHUIJZEN *et al.*, 2018). Além disso, o tecido adiposo contribui ainda com células-tronco mesenquimais, as quais podem se diferenciar em subpopulações de fibroblastos associados ao câncer, que por sua vez se relacionam com a resistência terapêutica e pior prognóstico (SCHICHENG *et al.*, 2018).

2.2.1 Macrófagos associados ao tumor (TAM)

TAMs compreendem uma subpopulação de elevada importância no contexto tumoral, sendo estes derivados de monócitos (Mφs). Atuantes por um lado na resposta imune pela fagocitose e apresentação de antígenos, e por outro, no reparo e reorganização tecidual, refletem a dicotomia Th1/Th2. Originados no saco vitelino e posteriormente, fígado fetal, os monócitos habitam a medula óssea e são recrutados sob o estímulo tumoral mediado por quimiocinas (CCL1, CXCL1, CXCL2 e CX3CL1, entre outras) e diferenciados em macrófagos por meio da secreção de CSF-1 por células neoplásicas, entre outras. Quando inseridos no TME, os Mφs são estimulados pela IL-4 a expressarem predominantemente o perfil Th2, não apenas permitindo o crescimento e progressão das células tumorais, como compondo a massa tumoral em até metade de seu volume total em alguns casos. Adicionalmente, a produção local de fatores como EGF e CSF-1, é associada à migração e metastização *in vivo*. No câncer de mama, especificamente, é reconhecida a alta importância de tal população, cuja presença é associada a pior desfecho clínico (ZHAO *et al.*, 2017).

2.3 METABOLISMO LIPÍDICO NO CÂNCER

Níveis lipídicos anormais no sangue estão intimamente associados com a metástase de muitos tipos de câncer e desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias (SHEN *et al.*, 2018).

Adipocinas (leptina, adiponectina, colágeno VI, entre outros) promovem crescimento e sobrevivência das células neoplásicas no CA de mama (IYENGAR *et al.*, 2005) (VONA-DAVIS *et al.*, 2007). A produção de metaloproteinases (MMP-11) no tecido adiposo é induzida pelas células cancerígenas, auxiliando-as a invadir as adjacências (ANDARAWEWA *et al.*, 2005). Adipócitos tumorais isolados apresentaram mudanças fenotípicas caracterizadas pela superexpressão de MMP-11, PAI-1 e IL-6 em comparação àqueles oriundos de glândulas mamárias saudáveis, permitindo um comportamento tumoral agressivo (MOTRESCU *et al.*, 2008). Em modelo animal, uma dieta hipercalórica rica em gordura induziu mudanças metabólicas, com o aumento da massa tumoral devido à limitação da resposta anti tumoral de linfócitos T CD8+, tanto devido à menor fração destes dentre os linfócitos CD45+ infiltrados, quanto pela menor expressão de fatores co-estimuladores e co-inibidores, como ICOS e PD-1, respectivamente. Concomitantemente, houve uma expressão diminuída da granzima B, de função citolítica. Não houve alteração na produção de citocinas inflamatórias (notadamente IFN γ e TNF- α). Populações celulares inseridas no TME respondem distintamente às alterações metabólicas sistêmicas, resultando em diferentes adaptações na utilização de ácidos graxos (RINGEL *et al.*, 2020).

Foram observados efeitos pró-tumoral em modelo murino de câncer de mama submetidos à uma dieta rica em lipídios. A superexpressão de prolil hidroxilase 3 (PHD3), um fator pró-apoptótico induzido por hipóxia, foi capaz de melhorar a ação antitumoral das células T, atenuando o efeito dietético. Múltiplas evidências sugerem, portanto, que uma reprogramação metabólica local induzida por uma dieta hiperlipídica altera a distribuição energética e reduz a imunidade antitumoral no TME, embora reversível (RINGEL *et al.*, 2020).

Adipócitos proporcionam diretamente substratos metabólicos para auxiliar as demandas metabólicas das células neoplásicas. Estudos em modelos animais demonstram que a invasão celular estimulada pelos adipócitos deve-se ao suprimento energético pela oxidação de ácidos graxos. A inibição de CPT1, uma enzima mitocondrial responsável pela formação de acilcarnitinas para oxidação nas mitocôndrias, abrandou a capacidade migratória tumoral apesar da interação entre células tumorais e adipócitos (WANG *et al.*, 2017). Mecanismo este agiria desde o desenvolvimento neoplásico inicial, dada a justaposição íntima entre adipócitos e células neoplásicas.

Além disso, uma secreção elevada de IGF-1 na obesidade foi proposta como mecanismo subjacente na resistência clínica à determinados esquemas quimioterápicos (NAHTA *et al.*, 2012) e até à radioterapia (BOCHET *et al.*, 2011), com as sinalizações tanto sistêmica quanto parácrina implicadas (RENEHAN *et al.*, 2006).

Estudos mostram que a glicólise aeróbica também se relaciona com a síntese lipídica pela via das pentoses-fosfato, com o NADPH servindo como importante substrato (PATRA *et al.*, 2014).

Desta forma consolida-se na literatura as transfigurações metabólicas na captação, síntese e oxidação dos lipídios no microambiente tumoral como sendo benéficas para a progressão neoplásica, promovendo proliferação, invasão e resistência terapêutica.

2.3.1 Metabolismo lipídico dos TAM

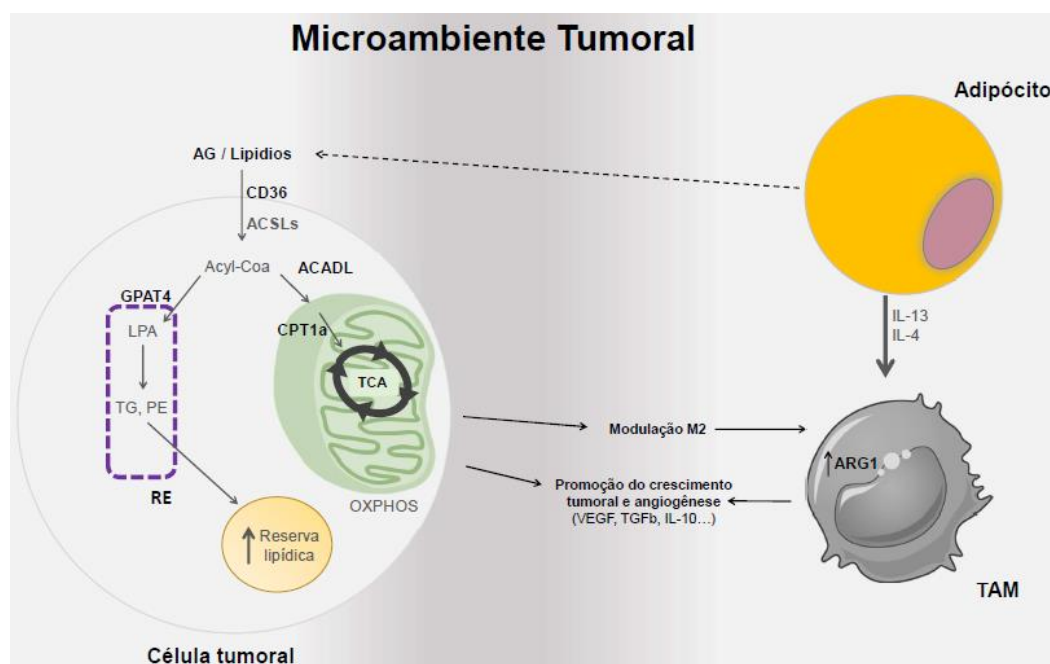
A síntese e acúmulo intracelular de lipídios é fundamental para a ativação inflamatória dos macrófagos, onde o perfil dessa ativação influencia a polarização celular (CASTOLDI *et al.*, 2020). Em modelo animal foi demonstrado que determinados ácidos graxos (como o ácido oleico e o ácido docosa-hexaenóico), induzem a expressão predominante de um fenótipo M2 (anti-inflamatório) (WANG *et al.*, 2018).

Estudos *in vivo* em murinos submetidos a uma dieta rica em lipídios indicam um aumento do tamanho médio dos adipócitos, e sua interação patológica com macrófagos prévia à transformação neoplásica promove angiogênese e prepara o ambiente para uma oncogênese acelerada, um mecanismo possivelmente crítico para a prevenção e/ou tratamento do câncer (ARENDT *et al.*, 2013). Adicionalmente, a proporção de macrófagos CD11b+, com papel pró-neoplásico e imunossupressor, também demonstrou-se aumentada (RINGEL *et al.*, 2020). Também foi descoberto que tais macrófagos, de polarização M2, apresentam elevada captação e acúmulo lipídico, além de distribuírem-se predominantemente em regiões onde os tecidos neoplásico e adiposo se sobrepõem, sendo caracterizados macrófagos associados a lipídios (LAM). A depleção desse subgrupo em modelo animal teve consequências antitumorais, oferecendo uma luz sobre futuras possibilidades terapêuticas (LIU *et al.*, 2022).

Macrófagos associados ao tumor, então, apresentam perfil anti-inflamatório caracterizado por acúmulo de lipídeos, o que proporciona ativamente a progressão tumoral.

Nesse trabalho abordamos a captação, síntese e oxidação de lipídeos no microambiente tumoral através da análise da expressão gênica de CD36, GPAT4, ACADL e CPT1a, além da expressão de arginase-1 (ARG1) expresso por TAMs (Figura 10). Uma introdução sobre o papel desses genes no metabolismo lipídico será descrita a seguir.

Figura 10 - Representação da interação intercelular no TME. A célula tumoral promove alterações metabólicas nos macrófagos e adipócitos, os quais atenuam a resposta inflamatória antitumoral e secretam substratos e mediadores os quais promovem o crescimento neoplásico



Fonte: O autor (2022).

2.4 CD36

O gene CD36, que codifica uma proteína transmembrana presente em diversas populações de células, atua no transporte de ácidos graxos. Evidências indicam sua exacerbação em macrófagos do tipo M2 anti-inflamatório, ao passo que encontra-se diminuída no subtipo M1, pró-inflamatório. Estudos também sugerem sua importância na ativação e perpetuação da cascata inflamatória em doenças crônicas. (PENNATHUR *et al.*, 2015) e como via promotora do crescimento de células

neoplásicas mamárias expostas à lipídios exógenos, demonstrando a importância da captação em paralelo à lipogênese (ZHAO *et al.*, 2017).

2.5 GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASE 4 (GPAT4)

Traduz uma acetiltransferase responsável pela transformação de G3P (glycerol 3-phosphate) em ácido lisofosfatídico, na síntese dos ácidos graxos. Altamente expressado nos tecidos glandulares mamários e envolvido na produção de leite, o GPAT4 está associado a mecanismos de acúmulo de triglicerídeos em adipócitos subdermais (KANASAWA *et al.*, 2019). Estudos sugerem que a expressão de GPAT4 contribui na atenuação da resposta inflamatória em macrófagos ativados, embora por mecanismos ainda não compreendidos (QUIROGA *et al.*, 2019). Sua influência no contexto oncológico também carece de estudos.

2.6 ACIL-COA DESIDROGENASE DE CADEIA LONGA (ACADL)

Gene que integra o mecanismo de oxidação dos ácidos graxos. A sua metilação está atrelada a um pior prognóstico nos pacientes portadores de câncer de mama (HILL *et al.*, 2012). Também encontra-se aumentado no carcinoma esofágico, correlacionando-se diretamente à progressão e disseminação tumoral (YU *et al.*, 2018).

Já outras pesquisas mostraram que no tumor pancreático pseudopapilar a expressão de ACADL encontra-se diminuída em relação à população normal (ZHU *et al.*, 2014). Analogamente, sua expressão diminui a capacidade metastática do carcinoma hepatocelular ao inibir a MMP-14 (GUO *et al.*, 2022).

2.7 CARNITINA PALMITOIL TRANSFERASE 1A (CPT1A)

É outro gene oxidativo, cuja proteína é inserida na membrana mitocondrial externa, ajuda na translocação dos ácidos graxos para a membrana interna mitocondrial. Sua expressão está associada à agressividade do tumor, ao passo que quando inibida, observa-se uma diminuição na síntese de ácidos graxos a partir da glicose, traduzida em uma ação antitumoral vista em modelo animal. Curiosamente, a

restrição desta via não diminuiu os níveis globais de AG, por prováveis mecanismos compensatórios (CATALINA-RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

2.8 ARGINASE 1 (ARG1)

Arginase é uma enzima responsável pela hidrólise de arginina em ornitina e ureia. As duas diferentes isoformas conhecidas, ARG1 e ARG2, diferem em sua distribuição nos diferentes órgãos e tecidos, com a primeira predominantemente encontrada no fígado, inserida no ciclo da ureia. Também foi identificada em macrófagos M2, na produção de poliamidas precursoras de colágeno, no contexto da reparação tecidual (BATISTA-GONZALEZ *et al.*, 2020). ARG1 apresenta um papel dicotômico no microambiente tumoral. Quando expressado em células mieloides atenua a resposta imune, porém nas células tumorais apresenta ação supressora tumoral ao inibir a sinalização da via AKT (MING *et al.*, 2020).

Desta forma, investigar o papel do metabolismo lipídico em pacientes com câncer de mama, em especial sua relação com a população significativa de macrófagos, é fundamental para melhor esclarecer os mecanismos de progressão tumoral e definir o real papel preditivo e prognóstico destes marcadores, além de definir possíveis alvos terapêuticos. O presente estudo, objetiva contribuir com a literatura atual e tentar descrever também a biologia tumoral e do seu microambiente em amostras de pacientes locais, oferecendo uma representação do impacto do câncer de mama na nossa realidade.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta análise caracteriza-se como um estudo de corte transversal de expressão genética em amostras de tecido tumoral de pacientes diagnosticadas com neoplasia maligna da mama.

3.2 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

Os fragmentos teciduais do tumor ou leito tumoral (em caso de regressão após tratamento neoadjuvante) de foram coletados durante ato cirúrgico no Hospital do Câncer de Pernambuco, situado em Recife-PE, no período de abril a julho de 2018, com um total de 55 amostras de pacientes adquiridas. Para compor o grupo controle foram adquiridos fragmentos de tecido mamário saudável de nove voluntárias submetidas a cirurgia estética em clínicas privadas de Recife e Caruaru. Imediatamente após a coleta, o material foi alocado em tubo plástico estéril contendo 1mL de RNAlater (Qiagen) e armazenado em freezer a -20°C até a extração de RNA. O armazenamento, processamento e análise das amostras ocorreram no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, situado na cidade de Recife – PE, entre março e julho de 2022.

3.3 CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DE PACIENTES

Para a seleção das pacientes elegíveis foram definidos os seguintes critérios de inclusão: sexo feminino, idade igual ou superior a 18 anos, diagnóstico de neoplasia maligna da mama comprovado por histopatologia, elegibilidade para tratamento cirúrgico e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Também foram estipulados critérios para inclusão do grupo controle: sexo feminino, idade igual ou superior a 18 anos, ausência de sinais e sintomas sugestivos de câncer ou doença autoimune nos últimos cinco anos, mamografia ou ultrassonografia das mamas com resultado normal nos últimos dois anos e assinatura do TCLE.

Analogamente, foram definidos os seguintes critérios de exclusão: diagnóstico de demais neoplasias ou doenças autoimunes há menos de cinco anos, material biológico insuficiente ou inadequadamente conservado.

3.4 EXTRAÇÃO DO RNA TECIDUAL

A extração de RNA foi realizada por meio do kit RNeasy Micro (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e avaliação da pureza do RNA foram feitas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Após a verificação, amostras de 34 pacientes e 3 controles apresentaram qualidade adequada para análise, sendo armazenadas em freezer -80°C até conversão em DNA complementar (cDNA). Dentre as 34 amostras neoplásicas, 25 foram de pacientes não tratadas com NAC, e 9 tratadas. Quanto à classificação TNM, 5 foram do estágio I, 23 do estágio II e 6 do estágio III. Separadas pelo grau histológico, obtivemos 2 para o grau 1 e 16 cada nos graus 2 e 3. Finalmente, por subtipo molecular, para o Luminal A foram 5 amostras, 14 para o Luminal B, 9 para o HER2 e 8 para o TN.

3.5 SÍNTESE DO CDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de material utilizando-se o kit QuantiTect Rev. Transcription (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, com o termociclador Applied Biosystems Veriti Dx 96-well Thermal Cycler Thermocycler. Após transcrição, as amostras foram estocadas em freezer -20°C.

3.6 QRT-PCR

As amostras foram submetidas a análise da expressão gênica através da análise de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em duplicata no instrumento StepOne™ Real-Time PCR System, com o sistema SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA) 2x, primers (concentrados a 100 nM) para amplificação do gene de interesse e água para um volume final de 10µl. Os primers utilizados para identificação do gene de interesse estão descritos abaixo (Tabela 3), com a β -actina utilizada como gene controle. As condições de amplificação foram realizadas de acordo com

instruções do fabricante, com o seguinte processo de ciclagem: 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos para ativação enzimática, seguidos por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por um minuto (anelamento e extensão).

Tabela 4 - Sequências dos primers *sense* e *antisense* para os genes estudados

Gene	Sequência <i>sense</i> (5'-3')	Sequência <i>antisense</i> (3'-5')
CD36	CAGTTCTCAATCTGGCTGTGGC	AACAGGGTACGGAACCAAACTCA
ARG1	GGCAGAAGTCAAGAAGAACGG	CCAGAGATGCTTCCAATTGCC
CPT1a	TCCAGTTGGCTTATCGTGGTG	CTAACGAGGGGTCGATCTTGG
ACADL	GGTGTTTCATCAGTAATGGGTCAT	CACTGTCTGTAGGTGAGCAACTG
GPAT4	GCCAGCCATTTTTGGAGTCTCC	CTCGCTCCATTCTCAAGGTAGC
β -actina	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

Fonte: O autor (2022).

3.7 MÉTODO DE ANÁLISE DOS DADOS

A expressão relativa de cada gene foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, tendo o grupo controle como referência, ou como indicado na legenda das figuras.

A análise das vias de metabolismo lipídico em macrófagos tumorais foi realizada utilizando R and R studio a partir de dados obtidos do sequenciamento de RNA depositado no repositório do NCBI sob o número GSE126268 publicado por Tuit S, Salvagno C, Kapellos TS, Hau CS et al. Transcriptional Signature Derived from Murine Tumor-Associated Macrophages Correlates with Poor Outcome in Breast Cancer Patients. Cell Rep 2019 Oct 29;29(5):1221-1235.e5.

A análise estatística será realizada utilizando o software Prism 8.0 (Graph pad). As comparações entre dois grupos serão calculadas utilizando testes t de Student two-tailed não pareados; as comparações de mais de dois grupos serão calculadas utilizando one-way ANOVA com Turkey para pós teste comparando múltiplos grupos. Será considerado significativo $p < 0,05$.

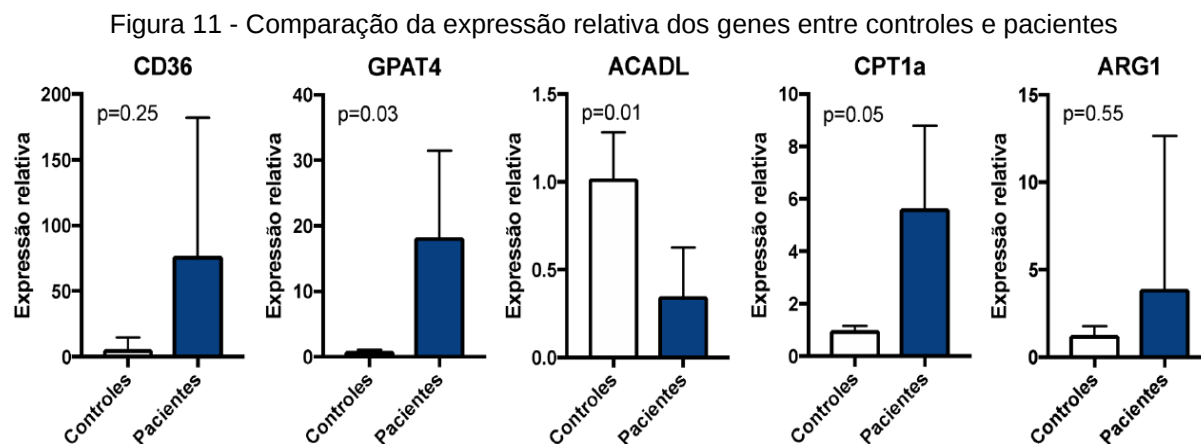
3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras de pacientes contempladas no estudo são oriundas de projeto de pesquisa prévio, já submetido a apreciação (CAAE: 75061717.3.0000.5205/ número do parecer 2.721.630) e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital do Câncer de Pernambuco (ANEXO 1). As participantes foram informadas sobre o objetivo do estudo, sua duração, possíveis efeitos adversos e a não obrigatoriedade de participação, bem como direito à desistência em qualquer etapa. Na aceitação em participar, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido contendo todos os dados relevantes da pesquisa, para a qual foram seguidos os preceitos da resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, visando à preservação dos quatro referenciais da bioética: autonomia, não-maleficência, beneficência e justiça. Também foi assegurada a confidencialidade dos dados coletados, cujas fichas foram especificadas pelas iniciais e registro hospitalar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA NO CA DE MAMA

Inicialmente, avaliamos a expressão gênica de CD36, GPAT4, ACADL, CPT1a e ARG1 nas amostras tumorais obtidas de pacientes diagnosticadas com câncer de mama e comparamos às amostras de pacientes controles. Observamos uma queda significativa na expressão de ACADL ($p = 0,01$), contrário às disponíveis na literatura (HILL *et al.*, 2012). Em contrapartida, houve uma importante elevação na expressão de GPAT4 e CPT1a, compatível com o aumento do metabolismo lipídico necessário para o desenvolvimento neoplásico (BALABAN *et al.*, 2017), síntese e oxidação lipídica. Nesta avaliação o CD36 e ARG1, apesar de graficamente elevados, não apresentaram significância estatística na análise (Figura 11). O banco de dados “The Human Protein Atlas” aponta que a expressão elevada de CPT1a associa-se a um pior prognóstico. Esses resultados sugerem que em pacientes com câncer de mama as vias de síntese e oxidação lipídica são moduladas positivamente.

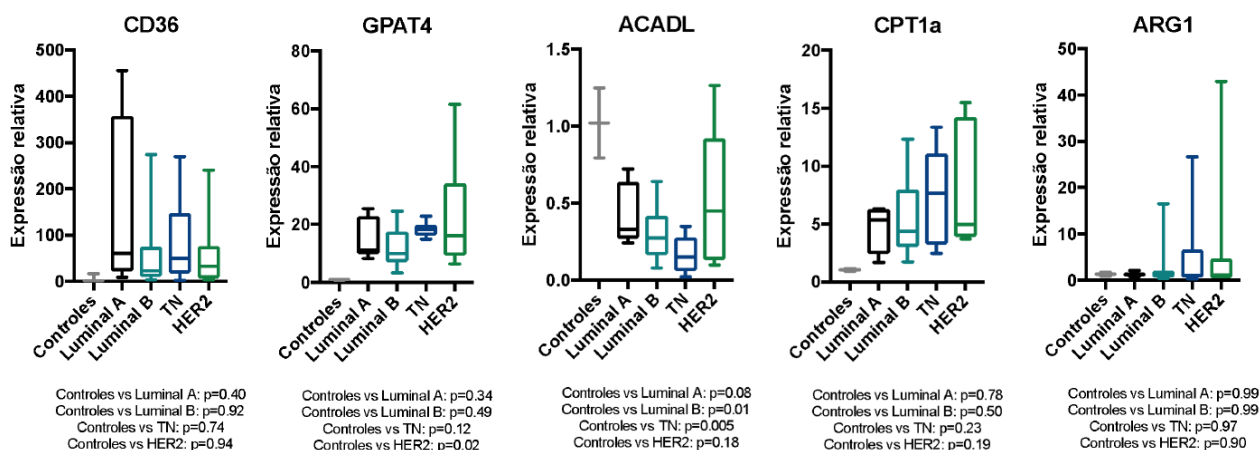


Fonte: O autor (2022).

Ao dividir os pacientes por grupos moleculares, observamos a persistência da expressão reduzida da ACADL, e os tumores HER2 sobressaindo-se quanto à expressão de GPAT4 (Figura 12), que encontra-se aumentada. Apesar da ausência de estudos prévios com este gene em específico, foi demonstrado que o GPAT2 associa-se diretamente a uma maior proliferação celular e grau histológico elevado *in*

vitro (PELLON *et al.*, 2014). Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos.

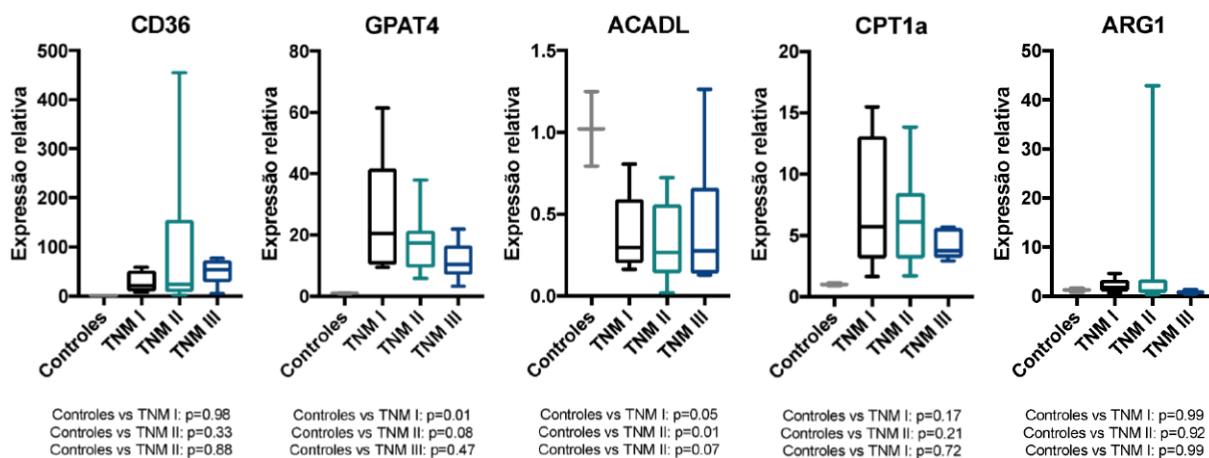
Figura 12 - Comparação da expressão relativa dos genes entre controles e pacientes (divididos por subtipo molecular)



Fonte: O autor (2022).

Ao se avaliar a expressão relativa nos pacientes separados pelo estágio TNM, a expressão de GPAT4 no estágio TNM I está significativamente aumentada em comparação com controles, porém não foi visualizada alteração estatisticamente relevante entre os diferentes estágios para os genes avaliados, apesar dos gráficos sugerirem que o GPAT4 apresenta leve queda com o avanço tumoral, tal qual a ACADL, que se encontra diminuída em relação aos controles (Figura 13). Tais dados sugerem que pode ocorrer alteração de demanda energética pelo tumor com a progressão tumoral. Apesar da sua maior expressão genética estar associada à progressão do CA de mama, não existem estudos comparativos a respeito de possíveis mudanças no metabolismo lipídico entre os diferentes estágios.

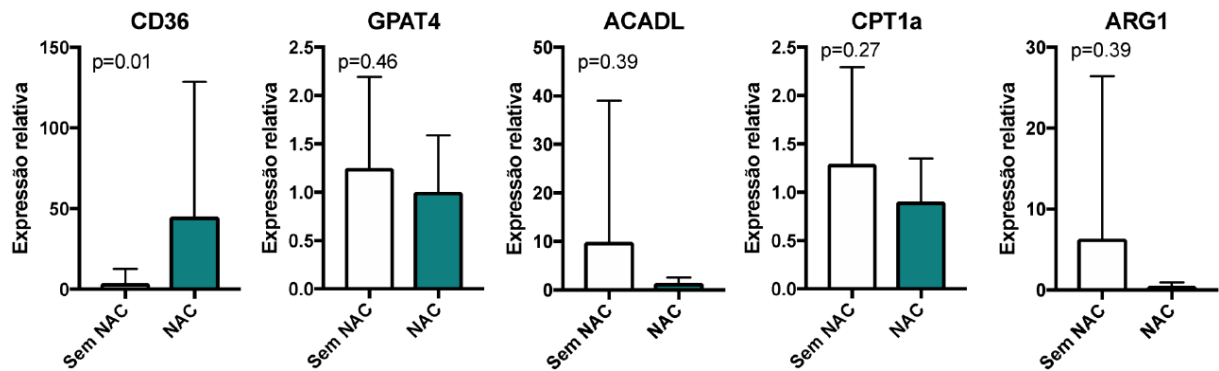
Figura 13 - Comparação da expressão relativa dos genes entre controles e pacientes (divididos por estágio TNM)



Fonte: O autor (2022).

No que diz respeito à realização de quimioterapia neoadjuvante (NAC), foi visto que a presença de CD36 em pacientes submetidos à terapia foi maior do que naqueles sem NAC (Figura 14). Na literatura existem relatos de que células-tronco leucêmicas, ao interagir com tecido adiposo adjacente, apresentam sua expressão de CD36 aumentada, o que associa-se a uma maior resistência à quimioterapia (YE *et al.*, 2016). Supomos, portanto, que o aumento observado tenha ocorrido por pressão seletiva, de modo que uma maior proporção das células tumorais sobreviventes possua tal mecanismo protetor. A NAC, na maioria dos protocolos, consiste na combinação de taxanos, que atuam na inibição de funções celulares por meio da estabilização de microtúbulos, e antraciclinas, as quais inibem a síntese de ácidos nucleicos e promovem a apoptose (ZAHEED *et al.*, 2019). A ausência de terapias cujo alvo sejam mecanismos energéticos possibilitaria que, em alguns casos, alterações metabólicas induzidas contribuíssem para a resistência terapêutica.

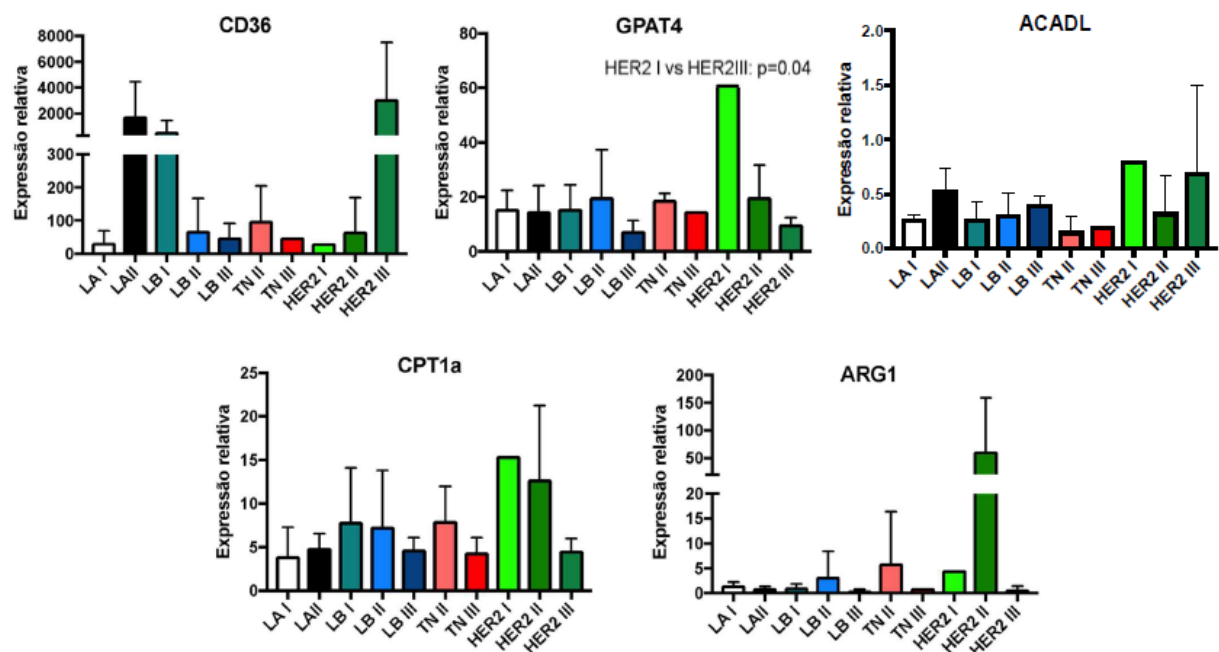
Figura 14 - Comparação da expressão relativa entre pacientes quanto à presença de QTneo



Fonte: O autor (2022).

Ao categorizar os pacientes por subtipo e estágio TNM, observou-se uma relação inversa entre a progressão de tumores HER2 e a expressão de GPAT4, sem dados estatísticos relevantes para as demais comparações (Figura 15). Tal achado pode estar associado à menor ativação dessa via metabólica com a desdiferenciação celular progressiva.

Figura 15 - Comparação da expressão relativa dos genes entre pacientes (divididos por subtipo e estadiamento TNM)

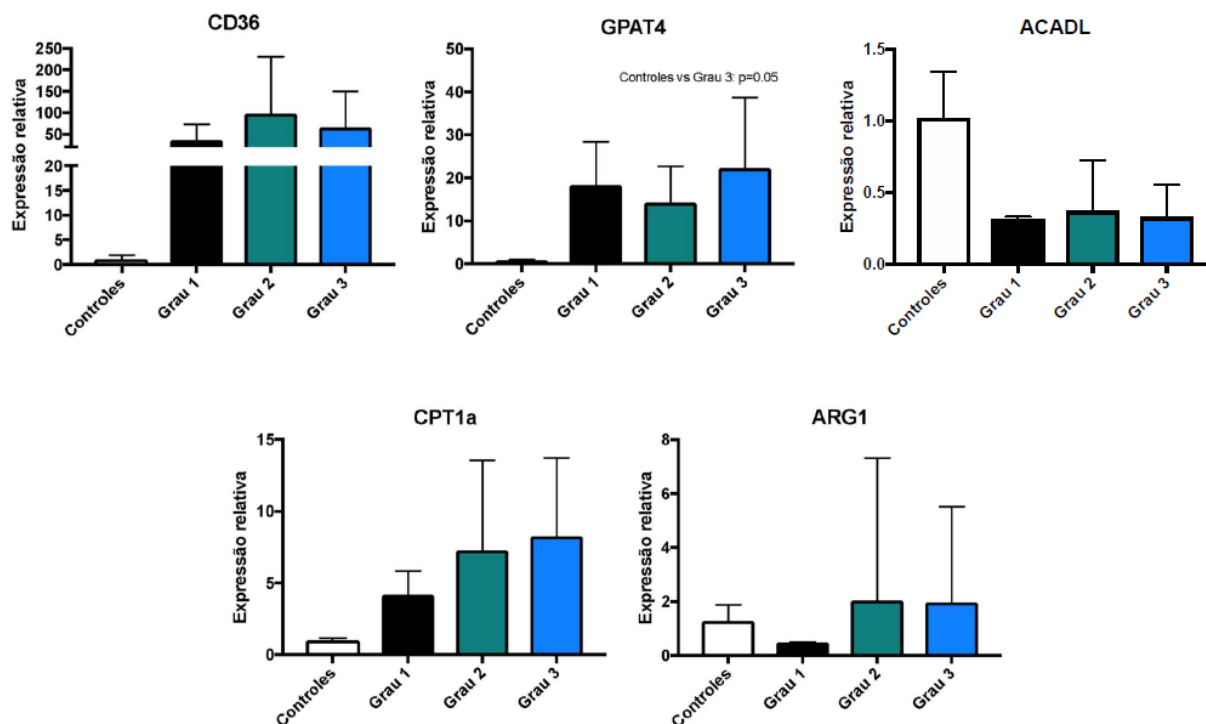


Fonte: O autor (2022).

Com relação ao grau histológico, não houve discordância estatística significativa entre os diferentes graus para os genes estudados (Figura 16). Entretanto, é sugerida uma relação crescente entre a desdiferenciação celular e a

expressão de CPT1a, como previamente demonstrado em linhagens luminais *in vitro* (JARIWALA *et al.*, 2021) .

Figura 16 - Comparação da expressão relativa dos genes entre controles e pacientes (divididos por grau histológico).

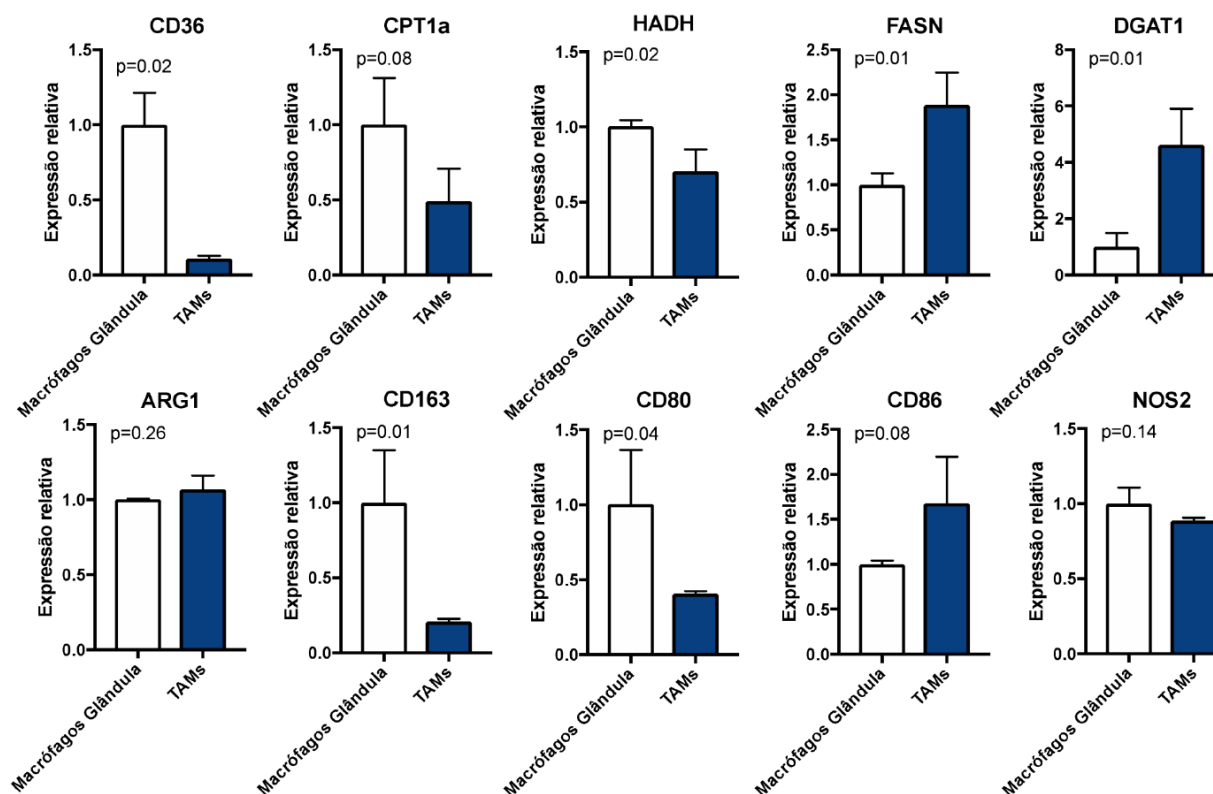


Fonte: O autor (2022).

4.2 EXPRESSÃO DE GENES EM MODELO MURINO

Adicionalmente, na avaliação da expressão de genes de captação, síntese, acúmulo e degradação de lipídeos em TAMs de modelo murino por meio de dados obtidos pela plataforma NCBI GEO DataSets, foi vista uma relação inversa entre a expressão de CD36 e CPT1a e a presença de câncer, bem como de HADH (gene envolvido na oxidação lipídica segundo Du *et al.*, 2021), CD163 (marcador para macrófagos M2) e CD80 (marcador para macrófagos M1). Por outro lado, os genes FASN e DGAT1 apresentaram-se elevados nos macrófagos tumorais, evidenciando aumento da síntese de lipídeos nessas células.

Figura 17 - Comparação da expressão relativa entre macrófagos murinos glandulares ou associados ao tumor.



Fonte: O autor (2022).

Em conjunto, esses resultados demonstram que apesar da influência do metabolismo lipídico na progressão tumoral, pode haver diferenças interespecíficas com relação aos mecanismos pelos quais as células neoplásicas influenciam o microambiente e outras populações nele inseridas, como os macrófagos e adipócitos associados ao tumor. Um estudo realizado por Wang *et al* (2018) demonstrou que adipócitos submetidos a exossomas obtidos de linhagens de carcinoma hepatocelular HepG2, em seguida implantados em camundongos, promoveram crescimento tumoral, angiogênese e um maior recrutamento de macrófagos para o microambiente tumoral, compatível com a elevação, na presente análise, de genes associados à síntese (FASN e DGAT1) e um perfil de diminuição da oxidação de ácidos graxos (queda de HADH).

Nossa análise demonstra que a síntese de lipídeos está aumentada em TAMs quando comparados aos macrófagos associados à glândula. Diferentemente ao que Liu *et al*, 2020 descobriu, que TAMs apresentam elevada captação e acúmulo lipídico e distribuírem-se predominantemente em regiões onde os tecidos neoplásico e adiposo se sobrepõem, sendo caracterizados macrófagos associados a lipídios (LAM)

e a depleção desse subgrupo em modelo animal teve consequências antitumorais, oferecendo uma luz sobre futuras possibilidades terapêuticas (LIU *et al.*, 2022) quanto a diminuição da captação de lipídeos por estas células. No entanto, o aumento da expressão de DGAT1 pode indicar acúmulo de lipídeos na nossa análise.

A expressão gênica de CD36 nas amostras de câncer de mama em nossa análise apresenta-se heterogeneamente aumentada, insinuando um aumento da captação de lipídeos por macrófagos do microambiente tumoral. Apesar de não uniforme, comparações entre diferentes subtipos não foram significativas.

O baixo número de amostras foi uma limitação para o estudo, que especialmente para determinados grupos, pode ter sido responsável pela ausência de diferenças estatísticas em algumas comparações. Outro fator passível de melhoria é a quantidade de informações clínicas adquiridas, de modo a esclarecer possíveis relações com a presença de comorbidades (como diabetes e tabagismo) e outros fatores.

São necessários estudos adicionais, portanto, para compreender os mecanismos pelos quais ocorre a sinergia entre TAMs e adipócitos e sua contribuição para o desenvolvimento de um TME propício para a expansão do tumor. Uma próxima etapa seria isolar as diferentes populações celulares presentes no microambiente do CA de mama, como macrófagos e adipócitos, e avaliar o acúmulo de lipídeos e outros produtos metabólicos em relação às características clínicas das pacientes oncológicas.

5 CONCLUSÃO

Como desfecho, pudemos ampliar o conhecimento e compreensão a respeito do papel dos mecanismos de transporte e utilização dos lipídios na interação entre células tumorais e imunes (mais especificamente macrófagos), contribuindo para as alterações imunes e metabólicas que culminam em uma progressão neoplásica facilitada. Oposto à literatura vigente, nossos resultados mostraram que a expressão do gene ACADL apresentou-se diminuída nas pacientes, enquanto os genes demais de interesse (CD36, GPAT4, CPT1A e ARG1) encontraram-se hiperativados, com significância estatística exceto pelo ARG1. A análise da expressão gênica do CD36 nas amostras de câncer de mama em nosso estudo, apesar de não significativa em algumas comparações, sugere um possível aumento da captação de lipídeos por macrófagos do microambiente tumoral. Adicionalmente, o aumento da síntese lipídica através do aumento da expressão de GPAT4 parece ser consistente nas análises realizadas em nosso estudo. Observamos um aumento desse gene quando comparados pacientes aos controles, quando avaliados os subtipos moleculares e estadiamento, apesar de diversos subtipos tumorais e estádios expressarem níveis diferentes, sem relação clara entre eles. Além disso, no modelo murino de câncer de mama os TAMs também se aproveitam da síntese de lipídeos como fonte energética, apesar da expressão gênica divergente quando comparado ao humano, o que aponta para diferenças interespecies quanto ao uso desse mecanismo metabólico no contexto do microambiente tumoral.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos longitudinais, preferencialmente prospectivos, e com maior amostragem, podem melhor avaliar a relação entre a superexpressão de determinados genes e o prognóstico clínico (resposta terapêutica, sobrevida, entre outros), bem como revelar relações não encontradas nesta análise.

Também fazem-se necessários estudos no âmbito da proteômica e lipidômica para avaliar o quanto as alterações vistas na expressão gênica contribuem para a captação e síntese de lipídeos estruturais e funcionais que contribuam para a progressão neoplásica. A histoquímica também pode trazer dados valiosos com relação às diferenças de expressão de determinados genes em grupos celulares distintos.

Por fim, ainda há muito no metabolismo lipídico a se esclarecer, especialmente no âmbito da interação entre os metabolismos sistêmico e local, em conjunto com o diálogo entre as diferentes populações celulares incluídas no microambiente tumoral. Foi visto que certas linhagens celulares de câncer de mama, quando submetidas a determinados padrões de lipídios exógenos apresentam diferentes graus de remodelamento de seu retículo endoplasmático, com consequentes mudanças no perfil de atividade enzimática (RIZZO et al., 2021). Desenvolver tais conhecimentos pode agregar implicações terapêuticas futuras, especialmente utilizando drogas que possam alterar o metabolismo das células imunes e tumorais quanto à síntese, oxidação e captação de lipídios, como terapia complementar.

REFERÊNCIAS

- ANDARAWEWA, K.L. et al. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. **Cancer Res**, 65(23), p. 10862-10871, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1231>. Acesso em: 30 junho 2022.
- ARENDT, L.M. et al. Obesity promotes breast cancer by CCL2-mediated macrophage recruitment and angiogenesis. **Cancer Research**, 73(19), p. 6080–6093, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0926>. Acesso em: 30 junho 2022.
- BAGHBAN, R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. **Cell Commun Signal**, 18(59), 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>. Acesso em: 30 junho 2022.
- BALABAN, S. et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. **Cancer & Metabolism**, 5, 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0163-7>. Acesso em: 30 junho 2022.
- BATISTA-GONZALEZ, A. et al. New Insights on the Role of Lipid Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages. **Frontiers in immunology**, 10, 2993, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02993>. Acesso em: 30 junho 2022.
- BOCHET, L. et al. Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. **Biochemical and biophysical research communications**, 411(1), p. 102–106, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.101>. Acesso em: 30 junho 2022.
- CASTOLDI, A. et al. Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function. **Nature communications**, 11(1), 4107, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17881-3>. Acesso em: 30 junho 2022.
- CATALINA-RODRIGUEZ, O. et al. The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. **Oncotarget**, 3(10), p. 1220–1235, 2012. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.714>. Acesso em: 30 junho 2022.
- DESHPANDE, G.U. et al. An Overview Of Prognostic Markers In Breast Cancer. **Medical journal, Armed Forces India**, 55(2), 129–132, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(17\)30268-X](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(17)30268-X). Acesso em: 30 junho 2022.
- DIRAT, B. et al. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. **Cancer research**, 71(7), 2455–2465, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>. Acesso em: 30 junho 2022.
- DU, Z. et al. Differentially expressed genes PCCA, ECHS1, and HADH are potential prognostic biomarkers for gastric cancer. **Science progress**, 104(2), 368504211011344, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1177/00368504211011344>. Acesso em: 30 junho 2022.

GUO, D. et al. ACADL Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Inhibiting Matrix Metalloproteinase 14. **Frontiers in oncology**, 12, 821484, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.821484>. Acesso em: 30 junho 2022.

HENRY, N.L. et al. **Abeloff's Clinical Oncology**. 6. ed. Philadelphia, Elsevier, 2020. Chapter 88: Cancer of the Breast.

HILL, V.K. et al. Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. **Cancer research**, 71(8), 2988–2999, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4026>. Acesso em: 30 junho 2022.

HOUTHUIJZEN, J.M. et al. Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment. **Cancer metastasis reviews**, 37(4), 577–597, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9768-3>. Acesso em: 30 junho 2022.

HOY, A.J. et al. Adipocyte-Tumor Cell Metabolic Crosstalk in Breast Cancer. **Trends in molecular medicine**, 23(5), 381–392, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.009>. Acesso em: 30 junho 2022.

HU, S. **Cancer Metabolomics**. Suíça, Springer Nature, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-51652-9>. Acesso em: 21 agosto 2022.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/neoplasia-maligna-da-mama-feminina-e-colo-do-uterio> Acesso em: 21 agosto 2022.

IYENGAR, P. et al. Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. **The Journal of clinical investigation**, 115(5), 1163–1176, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI23424>. Acesso em: 30 junho 2022.

JARIWALA, N. et al. CPT1A and fatty acid β -oxidation are essential for tumor cell growth and survival in hormone receptor-positive breast cancer. **NAR cancer**, 3(3), zcab035, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/narcan/zcab035>. Acesso em: 30 junho 2022.

JING, X. et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. **Molecular cancer**, 18(1), 157, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1089-9>. Acesso em: 30 junho 2022.

KARASAWA, K. et al. Transcriptional Regulation of Acyl-CoA:Glycerol-sn-3-Phosphate Acyltransferases. **International journal of molecular sciences**, 20(4), 964, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20040964>. Acesso em: 30 junho 2022.

KIELER, M. et al. More than just protein building blocks: how amino acids and related metabolic pathways fuel macrophage polarization. **The FEBS journal**, 288(12), 3694–3714, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/febs.15715>. Acesso em: 30 junho 2022.

LE, A. **The Heterogeneity of Cancer Metabolism**. Springer Cham, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0>.

LIU, J. et al. Chemotherapy response and survival of inflammatory breast cancer by hormone receptor- and HER2-defined molecular subtypes approximation: an analysis from the National Cancer Database. **Journal of cancer research and clinical oncology**, 143(1), 161–168, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2281-6>. Acesso em: 30 junho 2022.

LIU, Z. et al. Lipid-associated macrophages in the tumor-adipose microenvironment facilitate breast cancer progression. **Oncoimmunology**, 11(1), 2085432, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2085432>. Acesso em: 30 junho 2022.

MAKDISSI, F. et al. Breast cancer survival in a brazilian cancer center: a cohort study of 5,095 patients. **Mastology**, 29, 37-46, 2019. DOI: <https://doi.org/10.29289/2594539420190000437>. Acesso em: 30 junho 2022.

MIGOWSKI, A. et al. **Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil**. Rio de Janeiro, INCA, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102311X00074817>.

Ming Z, Zou Z, Cai K, et al. ARG1 functions as a tumor suppressor in breast cancer. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, 52(11), 1257–1264, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa116>. Acesso em: 30 junho 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigitel Brasil 2021**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: 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 2021. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

MOTRESCU, E.R., RIO, M.C. Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. **Biological chemistry**, 389(8), 1037–1041, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1515/BC.2008.110>. Acesso em: 30 junho 2022.

NAHTA, R. Deciphering the role of insulin-like growth factor-I receptor in trastuzumab resistance. **Chemotherapy research and practice**, 648965, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/648965>. Acesso em: 30 junho 2022.

PELLON-MAISON, M. et al. Glycerol-3-phosphate acyltransferase-2 behaves as a cancer testis gene and promotes growth and tumorigenicity of the breast cancer MDA-MB-231 cell line. **PloS one**, 9(6), e100896, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100896>. Acesso em: 30 junho 2022.

PENNATHUR, S. et al. The macrophage phagocytic receptor CD36 promotes fibrogenic pathways on removal of apoptotic cells during chronic kidney injury. **The American journal of pathology**, 185(8), 2232–2245, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.016>. Acesso em: 30 junho 2022.

QUIROGA, I.Y. et al. Glycerol-3-phosphate acyltransferases 3 and 4 direct glycerolipid synthesis and affect functionality in activated macrophages. **The Biochemical journal**, 476(1), 85–99, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1042/BCJ20180381>. Acesso em: 30 junho 2022.

RENEHAN, A.G. et al. Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, 17(8), 328–336, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.08.006>. Acesso em: 30 junho 2022.

RINGEL, A.E. et al. Obesity Shapes Metabolism in the Tumor Microenvironment to Suppress Anti-Tumor Immunity. **Cell**, 183(7), 1848–1866.e26, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.009>. Acesso em: 30 junho 2022.

RIZZO, A.M. et al. Exogenous Fatty Acids Modulate ER Lipid Composition and Metabolism in Breast Cancer Cells. **Cells**, 10(1), 175, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10010175>. Acesso em: 30 junho 2022.

SHEN, Y. et al. A comprehensive look at the role of hyperlipidemia in promoting colorectal cancer liver metastasis. **Journal of Cancer**, 9(16), 2981–2986, 2018. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.25640>. Acesso em: 30 junho 2022.

SHICHENG, S. et al. CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness, **Cell**, 172(4), 841–856.e16, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>. Acesso em: 30 junho 2022.

UHLEN, M. et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. **Science**, 357(6352), eaan2507, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>. Acesso em: 30 junho 2022.

VONA-DAVIS, L. ROSE, D.P. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. **Endocrine-related cancer**, 14(2), 189–206, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0068>. Acesso em: 30 junho 2022.

WANG, Q. et al. Effect of lipid-induced macrophage M1/M2 polarization on lipid metabolism in hepatocytes. **Chinese journal of hepatology**, 26(4), 276–281, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2018.04.009>. Acesso em: 30 junho 2022.

WANG, S. et al. Exosomes released by hepatocarcinoma cells endow adipocytes with tumor-promoting properties. **Journal of hematology & oncology**, 11(1), 82, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0625-1>. Acesso em: 30 junho 2022.

WANG, Y.Y. et al. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. **JCI insight**, 2(4), e87489, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87489>. Acesso em: 30 junho 2022.

YE, H. et al. Leukemic Stem Cells Evade Chemotherapy by Metabolic Adaptation to an Adipose Tissue Niche. **Cell stem cell**, 19(1), 23–37, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.001>. Acesso em: 30 junho 2022.

YU, D.L. et al. Acyl-CoA dehydrogenase long chain expression is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. **OncoTargets and therapy**, 11, 7643–7653, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S171963>. Acesso em: 30 junho 2022.

ZAHEED, M. et al. Sequencing of anthracyclines and taxanes in neoadjuvant and adjuvant therapy for early breast cancer. **The Cochrane database of systematic reviews**, 2(2), CD012873, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012873.pub2>. Acesso em: 30 junho 2022.

ZHAO, J. et al. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. **Oncology reports**, 38(4), 2105–2115, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2017.5864>. Acesso em: 30 junho 2022.

ZHAO, X. et al., Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. **Oncotarget**, 8(18), 30576–30586, 2017. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15736>. Acesso em: 15 junho 2022.

ZHU, Y. et al. Proteomic analysis of solid pseudopapillary tumor of the pancreas reveals dysfunction of the endoplasmic reticulum protein processing pathway. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, 13(10), 2593–2603, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.038786>. Acesso em: 30 junho 2022.

APÊNDICE A – CD8⁺ T CELL METABOLIC CHANGES IN BREAST CANCER

CD8⁺ T Cell Metabolic Changes in Breast Cancer

Angela Castoldi^{1,2,3}, Jennifer Lee^{4,5}, Daniel de Siqueira Carvalho³, Fabrício O. Souto^{1,2,3}

¹ Instituto Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

² Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste, Universidade Federal de Pernambuco, Caruaru, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

⁴ Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215, USA.

⁵ Current Address: The Jean Mayer-USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University School of Medicine, 711 Washington Street, Boston, MA 02111, USA.

Correspondence:

Dr. Angela Castoldi

E-mail: castoldi.albuquerque@ufpe.br

Instituto Keizo Asami / Federal University of Pernambuco - UFPE. Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil, CEP 52171-011

Abstract

Immunometabolism has advanced our understanding of how the cellular environment and nutrient availability regulates immune cell fate. Not only are metabolic pathways closely tied to cell signaling and differentiation, but can induce different subsets of immune cells to adopt unique metabolic programs, influencing disease progression. Dysregulation of immune cell metabolism plays an essential role in the progression of several diseases including breast cancer (BC). Metabolic reprogramming plays a critical role in regulating T cell functions. CD8⁺ T cells are an essential cell type within the tumor microenvironment (TME). To induce antitumor responses, CD8⁺ T cells need to adapt their metabolism to fulfill their energy requirement for effective function. However, different markers and immunologic techniques have made identifying specific CD8⁺ T cells subtypes in BC a challenge to the field. This review discusses the immunometabolic processes of CD8⁺ T cell in the TME in the context of BC and highlights the role of CD8⁺ T cell metabolic changes in tumor progression.

Keywords: Breast cancer, Tumor infiltrating lymphocytes, CD8⁺ T cells, Immunometabolism

ANEXO A – PARECER E APROVAÇÃO DO PROJETO NO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO miRNA ATRAVÉS DE BIOSENSOR EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA AUXÍLIO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIA MALIGNA DE MAMA

Pesquisador: ALEXANDRE CESAR VIEIRA DE SALES

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 75061717.3.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.721.630

Apresentação do Projeto:

Nas últimas décadas, tem havido um grande avanço na compreensão dos mecanismos moleculares que regem a origem, a progressão e o padrão de disseminação do câncer de mama e que têm repercussões diretas na identificação de novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas. Nesse contexto, tem-se observado a emergência de novos biomarcadores, substâncias que podem ser medidas experimentalmente e que indicam o funcionamento normal, patológico ou a resposta frente a agentes farmacológicos em um dado organismo. A identificação de mutações dos genes BRCA-1 e BRCA-2, a superexpressão da oncoproteína HER-2 por imunohistoquímica (IHQ) ou hibridização "in situ" por fluorescência (FISH) e o surgimento de painéis de risco genéticos para o câncer de mama representam exemplos de biomarcadores que têm se traduzido na escolha de tratamentos mais personalizados. Contudo, as estratégias para o rastreamento e o diagnóstico do câncer de mama sofreram poucas alterações ao longo do tempo.

Atualmente, a mamografia permanece como exame padrão ouro para o rastreio de câncer de mama entre mulheres a

partir dos 40 anos de idade e naquelas com risco aumentado para câncer de mama hereditário. Outros métodos diagnósticos como a ecografia e a ressonância nuclear magnética das mamas são considerados complementares à mamografia e têm, em geral elevado custo. Para o diagnóstico

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

UF: PE

Município: RECIFE

CEP: 50.040-000

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: ocp@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER- SPCC



Continuação do Parecer: 2.721.630

dessa neoplasia, a biópsia tecidual acrescida do exame anatomopatológico e IHQ constituem as técnicas mais utilizadas. Destarte, é necessário o desenvolvimento de pesquisas capazes de desenvolver e de testar novos métodos com potencialidade diagnóstica para o câncer de mama que agreguem características de factibilidade, sensibilidade, especificidade e de baixo custo. O Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA tem investido no desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico do câncer e de inúmeras outras patologias. Recentemente, foi testado um biossensor à base de grafeno e polipirrol para detectar o miRNA-155, molécula associada ao diagnóstico e ao prognóstico do câncer de mama e de alguns outros tumores, com resultados bem satisfatórios. O propósito do presente projeto de pesquisa é avaliar a detecção do miRNA-155 presente no soro de pacientes com câncer de mama localizado através de um biossensor à base de grafeno e polipirrol, após o isolamento dessa mesma molécula pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Detectar e quantificar o miRNA-155 através de biossensor eletroquímico baseado em grafeno e polipirrol no soro e em fragmento tumoral de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama, após prévia quantificação dessa molécula através de RT-PCR.

Objetivo Secundário:

- Descrever as características da amostra quanto à idade ao diagnóstico, estadiamento tumoral, tipo e grau histopatológicos, expressão de receptores de estrogênio, de progesterona, da oncoproteína HER-2 e do Ki-67.
- Detectar e quantificar o miRNA-155 através de RT-PCR em fragmento tumoral e no soro de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama localizada antes e entre os dias 15 e 30 após o tratamento cirúrgico para a doença.
- Detectar e quantificar o miRNA-155 através de biossensor eletroquímico baseado em grafeno e polipirrol em fragmento tumoral e no soro de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama localizada, quando houver superexpressão pela técnica de RT-PCR, antes e entre os dias 15 e 30 após o tratamento cirúrgico para a doença.
- Comparar a detecção do miRNA-155 pelos métodos de biossensor baseado em grafeno e polipirrol e de RT-PCR em amostras de material biológico (fragmento tumoral e soro) de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama localizada.
- Explorar a relação entre a expressão do miRNA-155 quantificada pelos métodos de RT-PCR e de biossensor com os subgrupos fenotípicos do câncer de mama.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: csp@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.721.630

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos dessa pesquisa às pacientes que se propuserem, voluntariamente, a participar do estudo serão pequenos e relacionados à coleta do sangue periférico e que incluem dor e formação de equimose no local da punção, além de necessidade de mais de uma picada no caso de difícil acesso venoso periférico. Para minimizar esses riscos, serão alocados

profissionais experientes em coleta de sangue periférico. No que tange à retirada do fragmento tumoral, ele ocorrerá no próprio ato operatório previamente indicado pelo médico da paciente e, dessa forma, os riscos serão inerentes ao procedimento executado e não à coleta do fragmento tumoral para a pesquisa. Outrossim, a participação voluntária das pacientes nessa pesquisa não alterará o planejamento terapêutico definido pelos médicos assistentes do Hospital do Câncer de Pernambuco. Está assegurado à paciente voluntária em participar dessa pesquisa, a sua retirada da mesma a qualquer momento, bem como o sigilo dos dados coletados e o acesso aos resultados consolidados ao final do estudo que será anexado ao seu prontuário.

Benefícios:

Esse projeto pretende expandir a utilização de biomarcadores específicos para o câncer de mama, neste caso o miRNA-155, para fins diagnósticos e também prognósticos através da utilização de métodos de baixo custo como plataformas biossensoras, por exemplo. Ademais, pretende-se expandir as possibilidades diagnósticas para o câncer de mama utilizando-se o sangue periférico, bem mais barato, facilmente coletado e menos doloroso que a mamografia. A pesquisa do miRNA em tecido tumoral visa identificar novos biomarcadores com potencial prognóstico em mulheres já diagnosticadas com câncer de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

de acordo com o pesquisador, projeto relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

apresentação de uma emenda com a inclusão de um novo assistente de pesquisa.

Endereço: Av. Cruz Cabugã, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: osp@hcp.org.br