

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

RAYANNE DA SILVA SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM TUMORES MAMÁRIOS
E CORRELAÇÃO COM IL-17 COMO FATOR INFLAMATÓRIO**

MANAUS
2021

RAYANNE DA SILVA SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM TUMORES MAMÁRIOS
E CORRELAÇÃO COM IL-17 COMO FATOR INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Artério Sorgi

Coorientadora: Profa. Dra. Kátia Luz Torres Silva

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729i Souza, Rayanne da Silva
Identificação de biomarcadores lipídicos em tumores mamários e
correlação com IL-17 como fator inflamatório / Rayanne da Silva
Souza . 2021
113 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Arterio Sorgi
Coorientadora: Kátia Luz Torres Silva
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Câncer de mama. 2. IL-17 - interleucina-17. 3. Mediadores
lipídicos. 4. Biomarcadores. I. Sorgi, Carlos Arterio. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

RAYANNE DA SILVA SOUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS EM TUMORES MAMÁRIOS
E CORRELAÇÃO COM IL-17 COMO FATOR INFLAMATÓRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Artério Sorgi (Presidente)
Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro
Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco
Universidade de São Paulo (USP)

Manaus, 26 de outubro de 2021

À minha mãe Maria do Socorro,
Ao meu pai Jorge Abreu,
À minha avó Maria Abreu (*in memoriam*),
À minha família.
Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora por terem me conduzido até aqui, pela força e intercessão nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais por todo amor, compreensão, apoio e incentivo durante minha jornada acadêmica. Agradeço principalmente as orações de minha mãe que sempre me fortaleceram.

À minha família, tias e primos, por todo incentivo.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Carlos Sorgi, por ter me dado a oportunidade de realizar esse projeto e por todo conhecimento adquirido. Agradeço toda compreensão e confiança e principalmente a parceria, o apoio e orientação durante a execução dos experimentos, discussão dos resultados e revisão da tese.

À minha coorientadora, a Profa. Dra. Kátia Luz Torres Silva, pelo apoio acadêmico e institucional. Por ter aberto os caminhos para que eu pudesse realizar minhas coletas na FCECON. Agradeço todo incentivo e parceria.

Agradeço, em especial, a todos os pacientes que aceitaram o desafio de participar da pesquisa. Agradeço a confiança, a colaboração e compreensão.

À toda equipe do centro cirúrgico da FCECON em nome da enfermeira chefe Graça Maria Godim.

Aos mastologistas da FCECON em nome da Dra. Hilka Flávia pelo apoio e compreensão durante minha estadia nas cirurgias e por terem me confiado as peças cirúrgicas.

À equipe do Laboratório de Anatomia Patológica da FCECON. À subgerente Arlene, aos administrativos e estagiários, aos histotécnicos, aos médicos patologistas e residentes, aos biólogos e serviços gerais. À Dra Monique Freire e à Dra. Rosilene Viana. E, em especial, ao patologista Dr. Maiko Ramos pelo suporte absoluto nas coletas de tecidos. Sem seu apoio, jamais teria conseguido realizar esse projeto. Agradeço a amizade, confiança e experiências compartilhadas.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da FCECON em nome do Dr. Carlos Victor Urtiga pelo apoio com algumas coletas de sangue e por cederem espaço e equipamento para algumas fases do trabalho.

A todos enfermeiros e técnicos de enfermagem da enfermaria da mastologia pela compreensão e apoio durante a abordagem dos pacientes.

Aos meus alunos e colaboradores de iniciação científica Bruna Guimarães, Bianca Brasil, Aleff Roque e Marcos Bruno pelo imenso apoio na abordagem dos pacientes e com as coletas de sangue.

Aos funcionários da Diretoria de Ensino e Pesquisa da FCECON pelo suporte administrativo.

Ao Diretor Presidente da FCECON, o Dr. Gerson Mourão, pela permissão em realizar o projeto.

Ao cirurgião plástico Dr. Elizeu Lavor e toda sua equipe, em especial a Enfermeira Hizabela, que prestaram todo suporte para coleta de tecido dos pacientes controles.

Ao Laboratório de Genômica da FHEMOAM em nome da Profa. Dra. Adriana Malheiro por nos permitir armazenar nossas amostras.

Ao Prof. Dr. Pristesh Lawani e a Dra Aguyda Barbosa pelo suporte no transporte das amostras para Ribeirão Preto.

Ao Laboratório de Imunologia das Parasitoses (FCFRP/USP) em nome da Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, Dra. Malena Martinez e do mestrando Vinicius Pimentel pelo suporte técnico para realização dos ensaios analíticos.

Aos meus colegas de Doutorado Pedro Vieira e Diana Mota por todo suporte e parceria durante a execução dos ensaios analíticos. Agradeço a amizade, as experiências e conhecimentos compartilhados.

Aos colegas Luana Macedo, Ana Paula Peti, Felipe Teixeira e Edson Júnior pela amizade e suporte em vários momentos dessa jornada.

Aos meus amigos do Grupo de Oração Jovem Nossa Senhora de Pentecostes pela amizade, incentivo e orações.

À Universidade Federal do Amazonas e à Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar o doutorado nessas instituições.

Ao PPGIBA pelo suporte acadêmico, institucional e financeiro.

Às Agências de Fomento do Estado do Amazonas (FAPEAM) e do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Inúmeras moléculas do microambiente tumoral podem atuar na progressão do câncer de mama. A IL-17 e espécies lipídicas têm sido apontados como fatores pró-tumorais envolvidos na proliferação, migração celular e metástase. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi quantificar espécies lipídicas nos tumores mamários, avaliar a influência de IL-17 no metabolismo lipídico e identificar potenciais biomarcadores. Neste estudo demonstramos que os níveis de IL-17 e EICs estiveram aumentados nos tumores mamários. Também mostramos que o metabolismo dos esfingolipídios está alterado no câncer de mama com aumento de Cer, dHCer e LacCer e diminuição de SM no tecido tumoral e que a distribuição desses lipídios é diferente nos subtipos de câncer com predomínio de SM nos luminais A e B e de dHCer no HER-2. Além disso, observamos perfis distintos de esfingolipídios nos soros pré e pós-cirúrgico, em que a distribuição desses lipídios após a retirada do tumor apresentou um perfil semelhante aos controles com exceção de HER-2. Constatamos que houve correlação entre IL-17 e esfingolipídios, inferindo que a citocina pode regular o metabolismo desses lipídios. As análises multivariadas revelaram que TXB2, 11-HETE, SM C16:0 e C18:1 são potenciais biomarcadores para o câncer de mama independente do subtipo de tumor e que as dHs d20:0/20:0 e d18:0/24:0 são potenciais biomarcadores para os subtipos luminal B e HER-2, respectivamente. A IL-17 também apresentou potencial biomarcador para luminal B. Esses resultados sugerem que os mediadores lipídicos são potenciais candidatos a biomarcadores para auxiliar no diagnóstico e no monitoramento da progressão da doença.

Palavras-chave: câncer de mama, IL-17, mediadores lipídicos, biomarcadores.

ABSTRACT

Numerous molecules of the tumor microenvironment can act on the progression of breast cancer. IL-17 and lipid species have been identified as protumorigenic factors involved in proliferation, cell migration and metastasis. In this context, the aim of this study was to quantify lipid species in breast tumors, evaluate the influence of IL-17 on lipid metabolism and identify potential biomarkers. In this study we demonstrated that IL-17 and EICs levels were increased in breast tumors. We also show that the metabolism of sphingolipids is altered in breast cancer with an increase in Cer, dH and LacCer and a decrease in SM in the tumor tissue and the distribution of these lipids is different in cancer subtypes with predominance of SM in the luminals A and B and dHCer in HER-2. In addition, we observed distinct profiles of sphingolipids in pre- and post-surgical sera, which the distribution of these lipids after tumor removal presented a profile similar to controls, except for HER-2. We found that there was a correlation between IL-17 and sphingolipids, inferring that cytokine can regulate the metabolism of these lipids. Multivariate analyzes revealed that TXB2, 11-HETE, SM C16:0 and C18:1 are potential biomarkers for breast cancer regardless of tumor subtype and dHCers d20:0/20:0 and d18:0/24: 0 are potential biomarkers for luminal B and HER-2 subtypes, respectively. IL-17 also showed biomarker potential for luminal B. These results suggest that lipid mediators are potential candidate biomarkers to support in the diagnosis and monitoring of disease progression.

Keywords: breast cancer, IL-17, lipid mediators, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da glândula mamária.....	18
Figura 2 – Processo de imunoeedição do câncer.	28
Figura 3: Vias de síntese dos eicosanoides.	33
Figura 4: Metabolismo dos esfingolipídios.	39
Figura 5. Produção aumentada de IL-17 em tumores mamários e a razão da reposta imune Th1/Th2 nestes tecidos.....	62
Figura 6. Produção diferenciada de eicosanoides nos tecidos tumorais comparadas com os tecidos normais e controles.	65
Figura 7. Produção de eicosanoides nos tecidos tumorais de subtipos de câncer de mama.	69
Figura 8. Produção de eicosanoides no soro pré-cirúrgico (AC) e pós-cirúrgico (PC) em pacientes com câncer de mama	70
Figura 9: Análise discriminante da produção de eicosanoides entre tumor e tecido normal.	71
Figura 10. Análises das correlações de Spearman entre IL-17 e os eicosanoides detectados nos subtipos de tumores de mama	72
Figura 11: Determinação dos metabólitos da via dos esfingolipídios no tecido tumoral e normal	74
Figura 12. Análise discriminante das espécies de esfingolipídios entre tumor e tecido normal.	76
Figura 13. Determinação do perfil de produção de esfingolipídios nos subtipos de tumor de mama	78
Figura 14. Frequência relativa das classes de esfingolipídios no soro pré- e pós-cirúrgico..	80
Figura 15. Análises das correlações de Spearman entre IL-17 e espécies de esfingolipídios detectados nos subtipos de tumores de mama.....	82
Figura 16. Curvas ROC para avaliar o potencial diagnóstico da IL-17 no câncer de mama.	84
Figura 17. Curvas ROC para avaliar o potencial diagnóstico de eicosanoides no câncer de mama.	86
Figura 18. Análise do potencial diagnóstico das dH no soro de pacientes HER-2.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos principais tipos histológicos de câncer de mama.....	23
Tabela 2. Resumo dos subtipos moleculares de acordo com o perfil imunohistoquímico	24
Tabela 3. Classes de medicamentos utilizados para o tratamento do câncer de mama	26
Tabela 4: Eicosanoides que foram investigados no estudo e em verde os que foram detectados nas amostras.	53
Tabela 5: Espécies de esfingolipídios que foram investigadas no estudo e em verde os lipídios que foram detectadas nas amostras.	54
Tabela 6: Variáveis sociodemográficas e de risco para o câncer de mama.....	59
Tabela 7: Variáveis clínicas das pacientes oncológicas	60
Tabela 8: Resultados das curvas ROC para avaliar o potencial dos esfingolipídios como biomarcadores (em verde $AUC > 0.7$ e $p < 0,05$)	87

LISTA DE ABREVIATURAS

13-HODE	ácido 13-hidroxiocetadecadienoico
APC	célula apresentadora de antígeno
AA	ácido araquidônico
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
BRCA	breast cancer gene
C1P	ceramida-1-fosfato
CAFs	fibroblastos associados ao câncer
CCL/CXC	quimiocina
Cer	ceramida
CERK	cer
CERS	ceramida quinase
CK	citoqueratina
COX	ciclooxigenase
CTLA-4	antígeno associado ao linfócito T citotóxico
CTLs	linfócitos T citotóxicos CD8+
DES	diidroceramida dessaturase
dHCer	diidroceramida
DP	receptor de PGD2
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
EICs	eicosanoides
EP	receptor de PGE2
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas
GalCer	galactosilceramida
GalCerS	galactosilceramida sintase
GCDase	galactosilceramidase
GCS	glicosilceramida sintase
G-CSF	fator estimulador de colônia granulocítica
GlcCDase	glicosilceramidase
GlcCer	glicosilceramida
GM-CSF	fator estimulador de colônia macrófagos e granulócitos
HER-2	receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HETE	ácido hidroxi-eicosatetraenoico
HexCer	hexosilceramida
HPLC	High performance liquid chromatography
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	receptor de PGI2
LacCer	lactosilceramida
LOX	lipoxigenase
LT	leucotrieno
LX	lipoxina
MDSCs	células supressoras derivadas da medula
MHC	complexo principal de histocompatibilidade

MMP	metaloproteinase
NK	célula natural killer
NKT	célula T natural killer
oxo-ETE	ácido oxo-eicosatetraenoico
PD-1	proteína de morte celular programada 1
PD-L1	ligante de PD-1
PDX	protectina
PG	prostaglandina
RE	receptor de estrógeno
RP	receptor de progesterona
RVD	resolvina
S1P	esfingosina-1-fosfato
SM	esfingomielina
SMase	esfingomielinase
SMS	sintase de esfingomielina
SPHK	esfingosina quinase
SPT	serina palmitoiltransferase
TAMS	macrófagos associados aos tumores fator de transformação do crescimento
TGFβ	beta
TILs	infiltrado linfocitário tumoral
TNBC	triple negative breast cancer
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TP ou TXA2R	receptor de TXA2
Treg	célula T reguladora
TXA2	tromboxano A2
TXB2	tromboxano B2
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Glândula mamária humana.....	17
2.2. O câncer de mama	19
2.2.1. Epidemiologia e Etiologia	19
2.2.2. Métodos Diagnósticos	21
2.2.3. Classificação dos tipos de câncer de mama	22
2.2.4. Tratamento do câncer de mama	24
2.3. Imunologia do câncer de mama.....	27
2.3.1. Papel da IL-17 no câncer de mama	30
2.4. O papel dos lipídios no câncer.....	31
2.4.1. Eicosanoides.....	31
2.4.2. Esfingolipídios	37
2.5. Biomarcadores lipídicos no câncer de mama	41
2.6. Abordagem lipidômica	43
3. JUSTIFICATIVA	45
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivo Geral.....	46
4.2. Objetivos Específicos.....	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.1. Tipo de Estudo.....	47
5.2. População de Pacientes Oncológicos.....	47
5.2.1. Critérios de Inclusão.....	47
5.2.2. Critérios de Exclusão	47
5.2.3. Caracterização dos Grupos.....	47
5.3. População de Pacientes Controles	47
5.4. Tamanho Amostral.....	47
5.5. Local do Estudo	48
5.6. Procedimento de abordagem às pacientes para coleta de dados	48
5.7. Coleta de Amostras dos Pacientes	49
5.7.1. Coleta de Sangue.....	49

5.7.2. Coleta de tecidos.....	49
5.8. Ensaios Analíticos	50
5.8.1. Preparo e processamento dos tecidos	50
5.8.2. Dosagem de mediadores inflamatórios solúveis	51
5.8.3. Extração de amostras em fase sólida (SPE) para eicosanoides	51
5.8.4. Extração líquido-líquido para esfingolipídios	52
5.8.5. Identificação e Quantificação de Eicosanoides	53
5.8.6. Identificação e Quantificação de Esfingolipídios	54
5.9. Processamento de Dados.....	55
5.10. Estudo de Seguimento das Pacientes Oncológicas	55
5.11. Análise Estatística	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.1. Perfil epidemiológico dos pacientes.....	57
6.2. Produção de mediadores inflamatórios solúveis.....	61
6.2.1. Expressão diferenciada de citocinas e quimiocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17 nas amostras de tumores e no soro de pacientes.....	61
6.2.2. Formação de eicosanoides nos tecidos tumorais de mama e sua correlação com a produção IL-17.....	64
6.3. Modulação do metabolismo de esfingolipídios no câncer de mama	73
6.4. Potencial diagnóstico dos candidatos a biomarcadores no câncer de mama	83
7. CONCLUSÕES	90
8. DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXO A – PARECER DO CEP/FCECON	104
APÊNDICE A – TCLE do Grupo Câncer	105
APÊNDICE B –TCLE do Grupo Controle	107
APÊNDICE C – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS.....	109
APÊNDICE D – Espécies lipídicas identificadas por LC/MS-MS.....	112

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o mais recorrente entre as mulheres sendo um grande problema de saúde pública com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos diagnosticados e 685.000 mortes registrados mundialmente em 2020 (SUNG et al., 2021). É caracterizado como uma doença heterogênea devido aos diversos aspectos morfológicos e moleculares que caracterizam diferentes subtipos de tumor de um mesmo órgão (HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

O câncer de mama é causado pela combinação de fatores genéticos e ambientais (KABEL, 2017) que promovem a proliferação exacerbada de células epiteliais do tecido mamário (DIMRI et al, 2005; IYER et al., 2013). Durante o desenvolvimento do tumor, as células neoplásicas interagem com as células do sistema imune por meio de eventos complexos, estabelecendo um microambiente tumoral imunossuprimido que favorece a progressão do câncer (DE LA CRUZ-MERINO et al., 2017).

Um dos mecanismos pelo qual as células tumorais promovem a imunossupressão é através da modulação da atividade das células do sistema imune que passam a secretar citocinas que favorecem o crescimento do tumor. Nesse contexto, a interleucina 17 (IL-17) é uma das citocinas pró-inflamatórias secretadas no microambiente tumoral e dependendo do tipo de câncer pode desempenhar tanto papel anti- quanto pró-tumoral (BAILEY et al., 2014). No câncer de mama, alguns estudos têm correlacionado o aumento do número de células Th17 e altos níveis de IL-17 com a progressão tumoral (COCHAUD et al., 2013).

Outra mudança que ocorre no microambiente tumoral devido às condições de hipoxia e à quantidade limitada de nutrientes é a reprogramação do metabolismo lipídico que é considerado um dos marcadores de malignidade. Os lipídios incluem triglicerídeos, fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol que servem como componentes das membranas celulares e ainda como precursores de moléculas envolvidas em múltiplos processos biológicos como os eicosanoides. Essas espécies lipídicas, não somente como componentes estruturais, são também moléculas de sinalização que estão envolvidas na proliferação, diferenciação e migração celular, favorecendo a progressão do câncer (MUNIR et al., 2019; WANG et al., 2020).

As alterações metabólicas no câncer têm sido alvo de inúmeros estudos (CÍFKOVÁ et al., 2017) e também para o desenvolvimento de novas tecnologias que pudessem compreender essas alterações no microambiente tumoral. Assim, surgiu a lipidômica baseada em espectrometria de massas capaz de identificar lipídios e quantificar suas mudanças em diferentes condições (TAN et al., 2020). Esta técnica pode ser aplicada na identificação de novos biomarcadores para diagnóstico, predição de prognóstico, monitoramento de tratamento e no acompanhamento pós-cirúrgico (ESCRIBÁ et al., 2015).

Nesse contexto, supõe-se que o metabolismo lipídico está alterado nos tumores mamários e que a IL-17 como fator inflamatório pode modular a produção e a função dessas moléculas, induzindo à progressão tumoral. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi identificar o perfil lipídico de tumores mamários, avaliar a influência da IL-17 no metabolismo dessas moléculas e identificar potenciais biomarcadores lipídicos para o câncer de mama.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Glândula mamária humana

A mama é uma glândula modificada da pele que tem a função de produzir e secretar leite para a nutrição, proteção e desenvolvimento do recém-nascido (HASSIOTOU; GEDDES, 2013). É o único órgão glandular que alcança o completo desenvolvimento após o nascimento e que, durante a vida, sofre diversas mudanças em sua estrutura e função, como expansões cíclicas correspondentes às mudanças hormonais no período menstrual e as mudanças drásticas durante a gravidez, lactação e pós-menopausa (INMAN et al., 2015).

A mama humana é composta de três estruturas principais: tecido mamário, pele e tecido subcutâneo. O tecido mamário está em contato com a fáscia superficial abaixo da pele e separado da fáscia do músculo peitoral maior pela bursa ou espaço retromamário. O tecido também é ligado à pele pelos ligamentos de Cooper que são fibras de tecido conectivo que se espalham pelo parênquima mamário (PANDYA; MOORE, 2011). A bursa e os ligamentos de Cooper permitem a mobilidade da mama na parede torácica. O parênquima mamário é constituído de 15 a 20 lobos que são divididos em 20 a 40 lóbulos (PANDYA; MOORE, 2011). Estes são constituídos de 10 a 100 alvéolos ou ácinos produtores de leite que dão origem a unidade ducto-lobular terminal. O leite produzido nestas unidades é drenado por ductos até os seios lactíferos abaixo da aréola que se abrem num orifício até os mamilos (PANDYA; MOORE, 2011).

A glândula mamária, histologicamente, é constituída de epitélio (basal e luminal) e estroma. O epitélio basal é constituído de uma pequena população de células-tronco que fornecem os diferentes tipos de células e também por células mioepiteliais que originam a camada externa da glândula. O epitélio luminal forma os ductos e alvéolos secretórios e é constituído por populações de células epiteliais que são definidas pelos seus status de receptores hormonais (MACIAS; HINCK, 2013). As células luminas e mioepiteliais são conectadas à membrana basal, uma fina camada de matriz extracelular que separa o epitélio do estroma adjacente (BAHCECIOGLU et al., 2020).

O estroma é constituído, em sua maior parte, por adipócitos cuja função é regular o crescimento e a angiogênese da glândula mamária. É composto de

fibroblastos que sintetizam enzimas, fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular como colágeno, proteoglicanos e fibronectina que dão suporte às células epiteliais e aos adipócitos (INMAN et al., 2015). Além destes, há também as células endoteliais vasculares e as células do sistema imune como macrófagos, eosinófilos e mastócitos (INMAN et al., 2015).

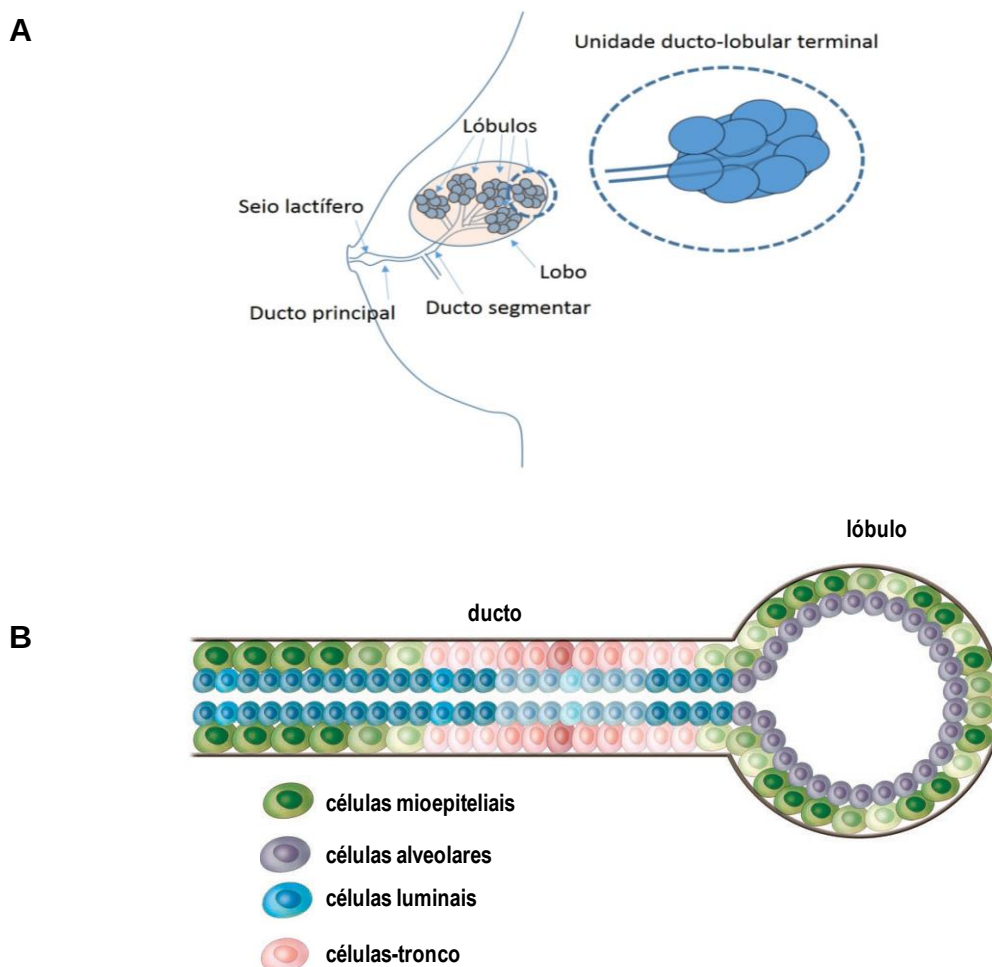


Figura 1 – Anatomia da glândula mamária. (A) parênquima mamário evidenciando principalmente os ductos e lóbulos. Fonte:(JALES, 2016). (B) estrutura da unidade ducto-lobular terminal mostrando a localização dos componentes celulares. Adaptado de (POLYAK, 2007).

A comunicação entre epitélio e estroma favorece o equilíbrio entre a proliferação e apoptose das células do tecido mamário, os quais são processos essenciais no desenvolvimento e remodelamento da glândula mamária e são regulados por fatores de crescimento, fatores estromais e pelos hormônios. Quando

ocorre algum desequilíbrio entre esses processos aumenta-se o risco do surgimento do câncer de mama (OSBORNE; RUDEL; SCHWARZMAN, 2015).

2.2. O câncer de mama

2.2.1. Epidemiologia e Etiologia

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente em todo mundo, ultrapassando o câncer de pulmão que era o tipo mais prevalente (SUNG et al., 2021). Para o ano de 2020, estima-se que 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama foram diagnosticados, representando 11,7% de todos os casos de câncer neste ano, e foram registradas, aproximadamente, 685.000 mortes no mesmo período (SUNG et al., 2021).

No Brasil, para cada ano do triênio de 2020-2022, estimam-se 66.280 novos casos de câncer de mama com um risco estimado de 61,61 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2019). Já o número de mortes no Brasil por câncer de mama foi de 18.069 no ano de 2019 (INCA, 2021). Em quase todas as regiões do país é o primeiro tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, com exceção da região Norte em que é o segundo tumor mais incidente, ficando atrás do câncer de colo de útero. No Estado do Amazonas e na capital Manaus, estima-se para o mesmo triênio 450 e 380 novos casos de câncer de mama (INCA, 2019).

No Amazonas, a Fundação Centro de Controle Oncologia do Amazonas (FCECON) é o centro de referência para o tratamento de neoplasias, atendendo tanto a população da capital quanto a do interior. Segundo os dados do relatório anual mais recente da gestão da FCECON, no ano de 2019 foram registrados 190 novos casos de câncer de mama e 120 óbitos provocados pela doença (FCECON, 2019). Um estudo recente, publicado por Pereira *et al.*, 2017, reportou um percentual de 10% de mulheres jovens com idade igual ou inferior a 40 anos com câncer de mama na FCECON entre os anos de 2003 e 2013 (PEREIRA; VIAPIANA; SILVA, 2017).

O câncer de mama é uma doença causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais e nela estão envolvidos múltiplos mecanismos moleculares relacionados à sua fisiopatologia que se correlacionam com diferentes

comportamentos clínicos (TAO et al., 2015). A doença afeta ambos os sexos, mas é mais prevalente nas mulheres e rara nos homens (LUKONG, 2017).

Vários fatores de risco estão associados ao câncer de mama, são eles: idade avançada (aumento da incidência após os 40 anos), histórico familiar, exposição aos hormônios endógenos e aos hormônios exógenos, nuliparidade ou gestação tardia, obesidade, dieta, tabaco e álcool (LAAMIRI et al., 2015).

Aproximadamente 95% dos novos casos de câncer de mama são diagnosticados em mulheres com 40 anos ou mais (COUGHLIN; CYPEL, 2012). Os casos de câncer de mama em mulheres inferiores aos 40 anos, geralmente, estão associados com o histórico familiar, apresentando mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que são responsáveis por quase metade das mutações hereditárias no câncer de mama. Outros estudos apontam mutações nos genes *TP53* e *PTEN* em casos de mulheres com idade inferior aos 30 anos acompanhados ou não de histórico familiar (ANDERS et al., 2010; TUNG et al., 2015).

Os hormônios reprodutivos endógenos podem influenciar no surgimento do câncer de mama por aumentar a proliferação celular, aumentar a possibilidade de dano ao DNA ou por promover o crescimento tumoral (COUGHLIN; CYPEL, 2012). Um longo período de exposição ao estrógeno vistos na menarca precoce e na menopausa tardia aumenta a susceptibilidade de desenvolver o câncer. A ausência de gestações ou nuliparidade bem como a falta da amamentação também são fatores de risco visto que durante a gestação e lactação há um desenvolvimento completo da mama, tornando a glândula menos vulnerável ao desenvolvimento do câncer (KAMIŃSKA et al., 2015). As terapias com contraceptivos ou de reposição hormonal também aumentam a susceptibilidade ao câncer de mama por maior exposição ao estrógeno (LAAMIRI et al., 2015).

Aproximadamente 75% dos casos de câncer de mama expressam receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), enquanto 20% mostram uma superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER-2). Os hormônios formam um complexo com seus receptores cuja localização se dá no núcleo das células que os expressam, e a partir do complexo formado, atuam como fatores de transcrição, ligando-se à região promotora de genes alvos relacionados à proliferação celular epitelial e morfogênese ductal (HAAKENSEN, 2011; SIMÕES et al., 2015). No câncer de mama, a expressão desses receptores pelas células

neoplásicas está associada à proliferação celular e ao crescimento do tumor (ABDULKAREEM; ZURMI, 2012).

2.2.2. Métodos Diagnósticos

A detecção precoce do câncer de mama pode reduzir as taxas de mortalidade significativamente em longo prazo. E o ponto mais crítico para um melhor diagnóstico da doença é detectar células cancerígenas em estágios precoces. Dentre os métodos diagnósticos de triagem, atualmente utilizados, estão os exames de imagem: a mamografia, o ultrassom, a ressonância magnética e a tomografia computadorizada (WANG, 2017).

A mamografia que é o padrão ouro para o rastreio da doença (SHAH, 2014). A realização da mamografia como método de triagem reduziu, mundialmente, em 19% a mortalidade relacionada ao câncer de mama por conseguir detectar massas palpáveis e não palpáveis (MCDONALD et al., 2016). O exame, apesar das limitações relacionadas à sensibilidade que geram altas taxas de resultados falso-positivos e falso-negativos, é o mais recomendado pela Sociedade Americana de Câncer (ACS) para mulheres a partir dos 40 anos que devem realizá-lo anualmente de forma preventiva (WANG, 2017).

O ultrassom é utilizado na triagem do câncer de mama quando não é possível a detecção pela mamografia tradicional, principalmente em tecidos densos. Geralmente, é indicado para o diagnóstico de massas palpáveis em mulheres jovens com menos de 30 anos, gestantes ou lactentes, bem como quando há anormalidades ou suspeita de anormalidades na mamografia (SHAH, 2014).

As lesões suspeitas de malignidade detectadas pelos exames de imagem são confirmadas através da biópsia para escolha do tratamento apropriado. Atualmente, a técnica mais utilizada é a core biópsia, na qual uma porção do tumor é removida para avaliação histológica, deixando o restante da lesão para ser removido posteriormente após diagnóstico definitivo (MATHENGE et al., 2014). Esse procedimento é realizado por agulha grossa, propiciando maiores quantidades de material para avaliação e, conseqüentemente, maior acurácia. Além disso, consegue distinguir carcinoma *in situ* dos carcinomas invasores e revelar o status dos receptores hormonais (ZHANG et al., 2013).

2.2.3. Classificação dos tipos de câncer de mama

A fim de facilitar a compreensão do prognóstico e a escolha do melhor tratamento, o câncer de mama é classificado segundo o tipo histológico e o perfil molecular de acordo com o laudo anatomopatológico e a imuno-histoquímica, respectivamente (MALHOTRA et al., 2010).

Segundo o tipo histológico, os carcinomas mamários são categorizados em lesões precursoras (carcinomas *in situ*) que não invadiram tecidos adjacentes e estão confinadas às estruturas que lhes deram origem: ductos ou lóbulos (SHARMA et al., 2010). Ou em carcinomas invasivos que possuem células epiteliais malignas com capacidade de invadir tecidos adjacentes e sofrer metástase para locais mais distantes (SINN; KREIPE, 2013). Na tabela 1 estão resumidas algumas características das lesões precursoras, do carcinoma invasivo de tipo não especial (o mais comum) e alguns tipos especiais de carcinomas invasivos.

Além dos carcinomas que possuem origem epitelial, há outros tumores malignos raros de mama que se desenvolvem a partir dos tecidos mesenquimais (estroma) como os tumores filóides e os sarcomas (MISHRA et al., 2013; KUMAR et al., 2016).

Atualmente, a classificação molecular divide o câncer de mama nos principais subtipos: luminal A, luminal B, HER-2 e *basal-like* de acordo com expressão dos receptores RE, RP e HER-2 (MAKKI, 2015). O luminal A representa 50% dos casos de câncer invasivo (ELIYATKIN et al., 2015). Esse tipo expressa receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e não expressam o receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER-2). Além disso, apresentam alta expressão de genes relacionados ao ER, apresentam bom prognóstico e são responsivos à terapia hormonal (DAI et al., 2015).

O luminal B representa 20% dos casos de câncer invasivo e também expressa RE e RP. O que o distingue do Luminal A é o índice do marcador de proliferação nuclear Ki-67 ($\geq 14\%$) (FRAGOMENI et al., 2018). Apresenta maior proliferação e maior grau histológico, o que o faz ter pior prognóstico em relação ao luminal A e, diferente deste, não apresenta uma resposta à terapia hormonal tão eficaz, mas apresenta uma melhor resposta à quimioterapia (ELIYATKIN et al., 2015). Alguns autores consideram também como luminal B, os tumores que expressam positividade tanto para os receptores hormonais (RE/RP) quanto para

HER-2. Outros autores preferem classificá-los como um grupo intermediário chamado de Luminal híbrido, separando-o dos luminais e HER-2 puros (SHAWARBY; AL-TAMIMI; AHMED, 2013).

Tabela 1. Características dos principais tipos histológicos de câncer de mama

LESÕES PRECURSORAS		
Tipo histológico	Características	Referências
Carcinoma ductal <i>in situ</i> (DCIS)	É o mais comum dos tipos não invasivos. Caracterizado por atipias nucleares e celulares. Apresenta potencial maligno e tem tendências a se tornar carcinoma invasivo.	(MAKKI, 2015)
Carcinoma lobular <i>in situ</i> (LCIS)	Caracterizado por proliferação de células pequenas e médias de núcleos normocromáticos dentro dos lóbulos que são caracterizadas como células em anel de sinete, produtoras de mucina. O LCIS é um fator de risco também, mas não um precursor obrigatório para o carcinoma invasivo.	(MAKKI, 2015)
CARCINOMAS INVASIVOS		
Carcinoma invasivo de tipo não especial (IDC)	É o mais comum, contabilizando 80% dos casos de carcinomas invasivos de mama. É um grupo heterogêneo de tumores que não exibem características suficientes para classificá-los em determinado tipo especial.	(SINN; KREIPE, 2013)
TIPOS ESPECIAIS	Carcinoma invasivo lobular (ILC), carcinoma tubular, carcinoma com características medulares, carcinoma mucinoso, carcinoma cribiforme	(ARPINO et al., 2004); (POORTMANS; BOLLET; LIMBERGEN, 2013); (YILMAZ et al., 2018)

O subtipo HER-2 (receptor do fator de crescimento epidermal humano 2) representa 15% a 20% dos casos de carcinoma invasivo. É o subtipo que apresenta uma superexpressão dessa oncoproteína que pertence à família dos receptores tirosina quinase e está associada à proliferação e sobrevivência celular (ENGLISH; ROQUE; SANTIN, 2013; MOASSER, 2007). Esse subtipo não expressa os receptores hormonais, apresenta um pior prognóstico em relação àqueles que não expressam HER-2 e são relativamente mais resistentes à terapia hormonal (CIRQUEIRA et al., 2011).

Os tumores *basal-like* ou basaloídes estão associados a um alto grau histológico, expressam altos níveis de marcadores mioepiteliais como citoqueratinas (CK) 5/6, 14, 17 e laminina, expressam o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e frequentemente apresentam mutação no gene supressor de tumor p53

(YERSAL; BARUTCA, 2014). A maioria desses tumores (80%) não expressam os receptores RE, RP e HER-2 e são referenciados como triplo negativo (TNBC) (BARROS; LEITE, 2015).

Os tumores TNBC representam 15% a 20% dos carcinomas invasivos. São mais freqüentes em mulheres jovens, pré-menopausa e afro-americanas e estão associados com mutações no gene *BCRA1* (TOFT; CRYNS, 2011; FRAGOMENI et al., 2018). Esse subtipo é bem conhecido pelo comportamento agressivo devido ao alto risco de metástase e de morte dentre de cinco anos após diagnóstico (PAREJA et al., 2016).

Tabela 2. Resumo dos subtipos moleculares de acordo com o perfil imunohistoquímico

Subtipo Molecular	Painel imunohistoquímico
Luminal A	RE e/ou RP+/- , HER-2- e Ki-67 < 14%
Luminal B	RE e/ou RP+/- , HER-2- e Ki-67 ≥ 14%
Luminal híbrido	RE e/ou RP+/- , HER2+ (score 3)
HER-2 superexpresso	RE-, RP-, HER2+ (score 3+)
Basal-like	RE-, RP-, HER2-, CK 5/6, EGFR+

2.2.4. Tratamento do câncer de mama

Há diversos tratamentos para o câncer de mama, incluindo terapia hormonal, quimioterapia, imunoterapia, radioterapia e a cirurgia. A escolha da melhor terapia é individual e é determinada pela idade, estagio da doença, tratamento anterior, tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos, status de receptor hormonal (HR), expressão de HER-2 e metástases (KALRA; EDWARDS, 2012).

A cirurgia, geralmente, é primeira forma de tratamento para o câncer de mama, dependendo do tipo de tumor (MATSEN; NEUMAYER, 2013). O manejo cirúrgico leva em consideração a segurança oncológica e a satisfação estética das pacientes (FRANCESCHINI et al., 2015). Dois tipos de cirurgia são disponíveis: a conservativa e a mastectomia radical. A cirurgia conservativa da mama, também conhecida como lumpectomia é indicada para pacientes em estágios precoces da doença e deve levar em conta diversas características do tumor como: possibilidade de se obter cirurgicamente margens livres da doença, tamanho do tumor em relação ao tamanho da mama, presença ou ausência de microcalcificações difusas,

multicentricidade e possibilidade de pós-tratamento com radioterapia (FRANCESCHINI et al., 2015).

A mastectomia radical é indicada nos casos em que a lumpectomia não é possível para a ressecção do tumor. Também é realizada quando a paciente opta por este método ou quando a paciente é gestante e não pode sofrer tratamento pós-cirúrgico com radioterapia. A mastectomia radical envolve a remoção de todo o tecido mamário, a fáscia pectoralis subjacente e o conteúdo axilar nos casos em que há acometimento de linfonodos axilares (ROSTAS; DYESS, 2012).

Em relação ao tratamento farmacológico do câncer de mama, há três modalidades: a terapia hormonal, a quimioterapia sistêmica e a imunoterapia (tabela 3). A terapia hormonal é indicada para os cânceres que expressam os receptores hormonais, é recomendada para mulheres pré ou pós-menopausa para auxiliar na remissão do câncer e é tipicamente utilizada para diminuir os riscos de recidiva após cirurgia (MCDUFFIE, 2014).

A quimioterapia utiliza drogas antineoplásicas que causam danos ao DNA, impedindo a divisão celular e, conseqüentemente, apoptose (AUNG et al., 2017). É indicada para tumores HER-2, triplo negativo e para alguns pacientes positivos para os receptores hormonais (WAKS; WINER, 2019). Já a imunoterapia é dirigida principalmente para HER-2 devido ao impacto que os cânceres positivos para este receptor têm no prognóstico e sobrevida dos pacientes; e para os receptores inibitórios (PD-1, PD-L1 e CTLA-4), modulando o sistema imune a fim de que mais células efectoras sejam ativadas e exerçam suas ações antitumorais na presença do antígeno tumoral (MCARTHUR; PAGE, 2016).

A radioterapia é outra ferramenta efetiva para o tratamento do câncer de mama. Nesta modalidade, a energia da radiação ionizante é depositada nas células, causando danos ao DNA e bloqueando a capacidade de divisão e proliferação celular. Dentre os tipos de radiação, há as eletromagnéticas por raios X ou raios gama e as radiações por partículas que incluem os feixes de elétrons, prótons e nêutrons (BASKAR et al., 2012). A indicação da radioterapia inclui estratégias combinadas com outras modalidades de tratamento como cirurgia, quimioterapia ou imunoterapia. Antes da cirurgia, a radioterapia tem o objetivo de diminuir o tumor e após a cirurgia é utilizada para destruir células tumorais microscópicas que possivelmente tenham ficado nos tecidos (BASKAR et al., 2012).

Tabela 3. Classes de medicamentos utilizados para o tratamento do câncer de mama

Terapia Hormonal			
Classe	Fármacos	Mecanismo de ação	Referências
Antagonista de RE	tamoxifeno	bloqueia a ligação do estrógeno com seu receptor (RE)	(TANG et al., 2016)
Modulador da expressão de RE	fulvestranto	interfere na síntese de RE	
Inibidores da aromatase	letrozol e anastrozol	inibe a aromatase, enzima responsável pela síntese de estrógeno	
Quimioterapia sistêmica			
Alquilantes	ciclofosfamida e thiotepa	inserem um grupo alquil no DNA interferindo com a replicação celular	(ZHAO; YANG; HASLAM, 2014)
Antraciclinas	doxorrubicina, epirrubicina e mitoxantrona	promove a ruptura do DNA prevenindo a divisão celular	
Agentes de platina	cisplatina, carboplatina	causam ligações cruzadas com proteínas cromossomais impedindo a síntese e o reparo do DNA nas células neoplásicas	
Taxanos	paclitaxel, docetaxel	inibidores de microtúbulos	
Alcaloides da vinca	vincristina, vinblastina, vinorelbina	inibidores de microtúbulos	
Outros	fluoruracila, metotrexato, capecitabina, gencitabina		
Imunoterapia			
Inibidores de HER-2	trastuzumabe e pertuzumabe	impedem a dimerização do receptor HER-2, parando o ciclo celular	(SCHROEDER; STEVENS; SRIDHAR, 2014)
	lapatinibe e afatinibe	inibidores da atividade tirosina quinase de Her2/EGFR	
Inibidores de checkpoints imunológicos	nivolumabe e pembrolizumabe	inibidores de PD-1	(SCHNEBLE et al., 2015; YU et al., 2016)
	atezolizumabe, avelumabe	inibidores de PD-L1	
	ipilimumabe	inibidores de CTLA-4	

2.3. Imunologia do câncer de mama

O câncer de mama é caracterizado pelo crescimento não controlado de células malignas do tecido epitelial mamário. Quando essas células epiteliais sofrem alguma alteração, seja por fatores genéticos ou ambientais, elas podem se transformar em células neoplásicas. O sistema imune interage com estas células através de eventos complexos, resultando na detecção seguida da eliminação do tumor ou evasão do sistema imune pelo tumor, processo chamado de imunoedição do câncer (DE LA CRUZ-MERINO et al., 2017).

Na primeira fase deste processo conhecida como eliminação ou imunovigilância, as células neoplásicas, caracterizadas como imunogênicas, passam a expressar antígenos tumorais em suas superfícies celulares. Essas células podem ser eliminadas diretamente pela ação das células natural killer (NK), células T natural killer (NKT) e pelas células T $\gamma\delta$ (WOO et al., 2015). Ou podem ser reconhecidas por células apresentadoras de antígenos (APC), como as células dendríticas e macrófagos que apresentarão os antígenos às células T via moléculas de MHC classe I ou II, resultando na ativação, migração e formação de um infiltrado de células efectoras (CHEN; MELLMAN, 2013).

Algumas variantes da linhagem tumoral não conseguem ser eliminadas e acredita-se que elas entram em fase de equilíbrio com o sistema imune. Nesta fase postula-se que as células neoplásicas continuam adquirindo características de malignidade e as células do sistema imune continuam a erradicá-las para controlar a progressão tumoral (CHOW; MÖLLER; SMYTH, 2012). Quando o sistema imune falha em eliminar o tumor, o processo resulta na seleção de células neoplásicas capazes de resistir, evitar e suprimir a resposta imune antitumoral, fase conhecida como escape (SWANN; SMYTH, 2007). Durante esta fase, o sistema imune já não consegue mais conter a proliferação dessas células, resultando no aumento do tamanho do tumor que é a fase detectada no diagnóstico por imagens (SWANN; SMYTH, 2007; KIM, 2007).

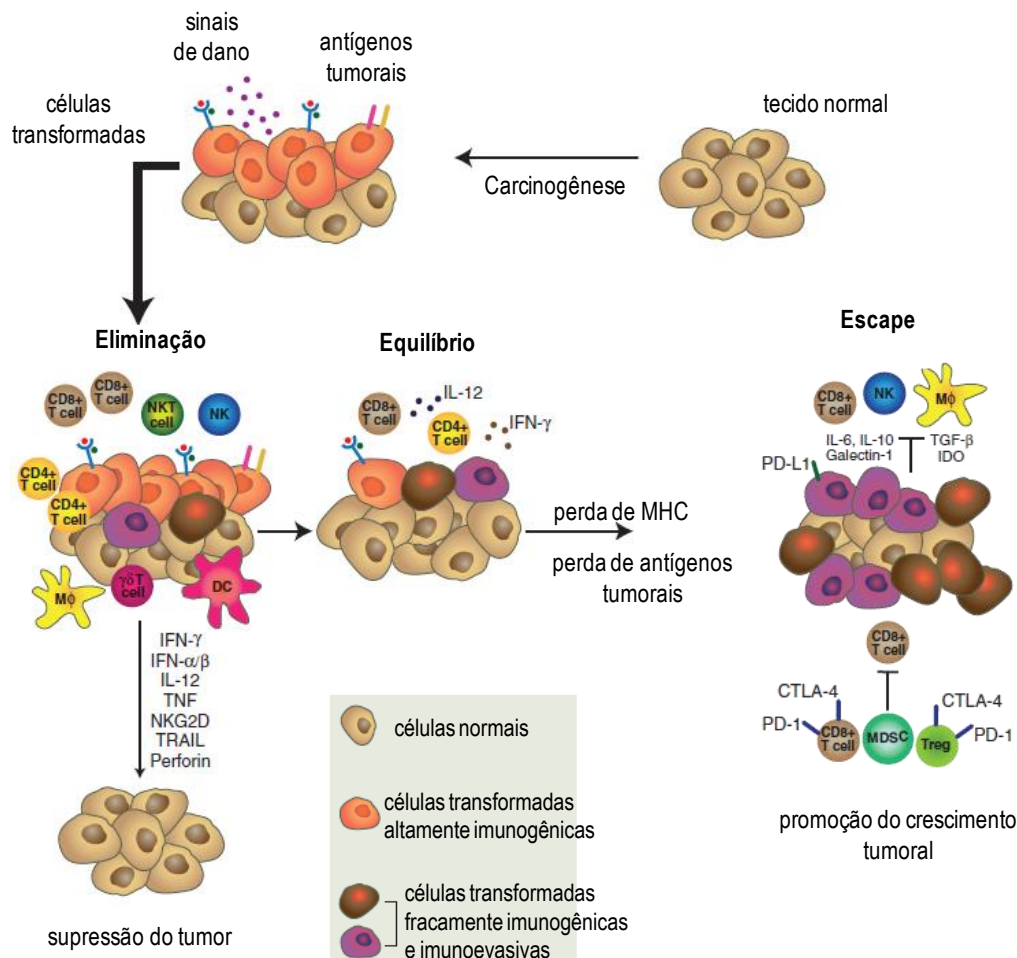


Figura 2 – Processo de imunoeedição do câncer. Por estímulos genéticos ou ambientais, as células do tecido normal podem dar origem às células transformadas ou neoplásicas altamente imunogênicas que expressam antígenos tumorais e moléculas de MHC. Na primeira fase da imunoeedição, a de eliminação, as células da imunidade inata e adaptativa agem em conjunto, por meio de citocinas, para eliminar as células neoplásicas e suprimir o tumor. As células tumorais remanescentes entram na fase de equilíbrio com o sistema imune, continuam se transformando através da diminuição da imunogenicidade e perda da expressão de moléculas de MHC e as células do sistema imune continuam tentando combatê-las. Quando ocorre a perda desse equilíbrio e o sistema imune falha em reconhecer as células tumorais, estas entram para a fase de escape e agem como moduladoras da imunidade a fim de o microambiente tumoral se torne imunossuprimido e favoreça o crescimento do tumor. Fonte: Adaptado de (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

O microambiente tumoral é constituído não somente por células neoplásicas, mas também por células imunes imunossupressoras e imunoestimuladoras (SALEMME et al., 2021). As células supressoras derivadas da mielóide (MDSCs),

através da liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são capazes de induzir anergia em células T efetoras, recrutam Treg e promovem a polarização de macrófagos para o perfil M2 (SALEMME et al., 2021). Os fibroblastos associados ao câncer (CAFs) secretam fatores promotores de angiogênese, ativam a EMT e estão envolvidos na proliferação, sobrevivência, invasão e metástase das células tumorais (BAHCECIOGLU et al., 2020).

Os macrófagos associados aos tumores (TAMs) formam a principal população de células no câncer de mama. Os TAMs são principalmente do fenótipo M2, associado às citocinas do perfil Th2 (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015). Eles secretam fatores angiogênicos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) que estimulam a angiogênese dentro do tumor. E secretam metaloproteinases (MMPs), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), CCL2 e CCL18 que ativam a transição epitélio-mesenquimal (EMT), promovendo invasão e metástase (SALEMME et al., 2021).

Os linfócitos T infiltrantes de tumor (TILs) desempenham papel chave no microambiente tumoral (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015). Nos TILs obtidos das biópsias de câncer de mama foram observados principalmente linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs), T helperCD4⁺ (Th) e células T regulatórias (Treg). Os CTLs são os elementos cruciais na resposta antitumoral e estão associados a maior sobrevida dos pacientes em vários tipos de câncer (DE LA CRUZ-MERINO et al., 2017). Os efeitos citotóxicos dessas células dependem de sinais co-estimulatórios ou co-inibitórios por moléculas denominadas de checkpoints imunológicos como PD-1 e CTLA-4 que inibem a ativação e ação das células T efetoras (BUCHBINDER; DESAI, 2016)

Os linfócitos T helper produzem citocinas que ativam e potencializam a ação dos CTLs. Já as células Treg funcionam como supressores da resposta antitumoral, suprimindo a produção de citocinas, ativação e proliferação de TCD4⁺ e TCD8⁺, com objetivo de prevenir maiores danos celulares (DE LA CRUZ-MERINO et al., 2017). Os TILs estão dispostos tanto ao redor das células neoplásicas (TILs estromais) ou dentro do tumor (intratumorais). Para uma ação eficaz da imunovigilância é esperado que o número de células CTLs seja superior ao das células Treg, e que estes linfócitos estejam preferencialmente no estroma que no interior do tumor para

evitar a imunomodulação pelas células neoplásicas (TEIXEIRA et al., 2016; LADOIRE et al., 2016).

As células NK reconhecem e eliminam células que não expressam MHC de classe I, o que é um mecanismo de escape de vários cânceres. Entretanto, no câncer de mama, há um fenótipo de NK infiltrante de tumor ($CD56^{\text{bright}}CD16^{-}$) que secreta MMP9 e VEGF e está associado com invasão e angiogênese (SALEMME et al., 2021).

2.3.1. Papel da IL-17 no câncer de mama

Recentemente, um subconjunto de linfócitos T secretores principalmente da citocina pró-inflamatória IL-17, as células Th17 têm ganhado atenção devido às contribuições nas infecções, na autoimunidade e na imunidade tumoral (FABRE et al., 2016). As células Th17 são importantes mediadores inflamatórios em uma variedade de doenças autoimunes e inflamatórias como psoríase, artrite reumatoide e doenças inflamatórias intestinais e, conseqüentemente, a citocina IL-17 tornou-se um alvo terapêutico no tratamento dessas doenças (FABRE et al., 2016).

A IL-17 é uma família constituída de seis citocinas (IL-17A – IL-17F) e cinco receptores (IL-17RA, RB, RC, RD e RE) (GU; WU; LI, 2013). A IL-17A foi a primeira a ser reconhecida em roedores e nomeada de CTLA-8 (MURUGAIYAN; SAHA, 2009). Ela induz a produção de outras citocinas como IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1, TGF- β , TNF- α , de quimionas como CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2, CCL7 e metaloproteinases (MMP1, MMP3 e MMP13) pelas células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (BIE et al., 2017). As outras citocinas da família apresentam homologia com a IL-17A, sendo a IL-17F a que apresenta maior similaridade e IL-17E a mais divergente (BIE et al., 2017). As funções das outras cinco são pouco conhecidas, mas acredita-se que parcialmente coincidam com as da IL-17A (BIE et al., 2017). A IL-17A se liga ao seu receptor composto de um heterodímero (IL-17RA/IL-17RC) cuja expressão está presente em todas as células (COCHAUD et al., 2013). A IL-17A é produzida, principalmente, por células Th17, mas também pode ser produzida por macrófagos, células dendríticas, NK, NKT, células T $\gamma\delta$, CTLs e neutrófilos (COCHAUD et al., 2013).

No ambiente tumoral tem-se observado o papel ambíguo da IL-17 em promover a imunidade antitumoral ou o crescimento do tumor, dependendo do tipo

de câncer (BENEVIDES et al., 2013). Vários estudos sobre câncer de mama têm correlacionado a maior expressão de IL-17 e o aumento gradual do número de células Th17 com a progressão tumoral (COCHAUD et al., 2013). No estudo de Su et al. foram observados altos níveis de IL-17 e um maior número de células Th17 nos TILs de pacientes com câncer de mama em relação às amostras de pacientes saudáveis (SU et al., 2010). Chen et al. observaram em 207 amostras de carcinoma mamário a presença de células produtoras de IL-17 e dentre essas amostras, 37 pacientes apresentaram um alto número de células produtoras de IL-17 que foi correlacionado com o subtipo triplo negativo (TNBC) de baixo prognóstico e menor sobrevida (CHEN et al., 2013). Ambos os estudos correlacionaram a produção de IL-17 e o aumento do número de células Th17 com a progressão do câncer de mama e também a um subtipo mais agressivo.

Benevides et al., utilizaram modelo de tumor mamário murino metastático (4T-1) e não metastático (67NR), demonstrando que a IL-17 foi produzida no tecido tumoral por linfócitos T CD4 infiltrados, e correlacionando este evento com a progressão do tumor metastático. A neutralização da IL-17 com uso de anticorpos inibiu o crescimento tumoral, a migração de neutrófilos para o tumor e a metástase. Contudo, foi observado que a IL-17 não tinha apenas funções relacionadas aos componentes do sistema imune, pois a IL-17 também teve efeito direto nas células tumorais 4T-1, estimulando a secreção de IL-6 e CCL20. O tratamento com IL-17 alterou o perfil de expressão gênica em células tumorais 67NR, nas quais houve um aumento da expressão de genes envolvidos com a adesão celular, proliferação e migração de células tumorais, sugerindo que a IL-17 tem efeito determinante na agressividade de células tumorais (BENEVIDES et al., 2015).

2.4. O papel dos lipídios no câncer

2.4.1. Eicosanoides

Os eicosanoides são moléculas lipídicas sinalizadoras que desempenham funções importantes tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, como por exemplo, na homeostase tecidual, na defesa do hospedeiro e na inflamação. Esses mediadores lipídicos estão envolvidos em diversos processos celulares como ativação, migração, metabolismo, proliferação e morte celular e têm papel

importante em doenças crônicas como asma, alergia, doenças autoimunes e câncer (BOZZA et al., 2011; LUO; LIU, 2020).

O termo eicosanoide é derivado da palavra grega “eicosa” que significa vinte e descreve um conjunto de lipídios derivados de ácidos graxos poliinsaturados com 20 átomos de carbono em sua cadeia (ESSER-VON BIEREN, 2017), como o ácido dihomo-gama-linolênico (DGLA), o ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) (GOMES; SOUZA; COLQUHOUN, 2018).

O ácido araquidônico, por ser constituinte de todas as células, é o principal precursor dos eicosanoides. Após estímulo, o AA é liberado dos reservatórios de fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A₂ e vai para o citosol (BENNETT; GILROY, 2016). Lá, ele é metabolizado por três vias distintas: a das ciclooxygenases para produzir os prostanoídes; a das lipoxigenases para produzir os ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETEs), leucotrienos, lipoxinas e hepoxilinas; e a via do citocromo P450 para produzir ácidos graxos epoxigenados (EETs) (JOHNSON; KLECZKO; NEMENOFF, 2020).

Os prostanoídes incluem as prostaglandinas (PG) D₂ (PGD₂), E₂ (PGE₂), F_{2α} (PGF_{2α}), a prostaciclina I₂ (PGI₂) e o tromboxano A₂ (TXA₂). Esses mediadores são produzidos a partir da oxigenação do ácido araquidônico num endoperóxido intermediário instável, a prostaglandina H₂ (PGH₂), através das enzimas ciclooxygenases (COXs). A PGH₂ é posteriormente convertida nos prostanoídes a partir de sintases ou isomerases (WANG; HONN; NIE, 2007). PGI₂ e TXA₂ são quimicamente instáveis e são degradados rapidamente em seus produtos inativos (6-keto-PGF_{1α} e TXB₂) entre 30 segundos a poucos minutos. Já as outras prostaglandinas são quimicamente estáveis e são degradadas lentamente (YUHKI et al., 2011).

Os prostanoídes exercem suas funções biológicas de forma autócrina e parácrina através de sua ligação com seus receptores cognatos de superfície celular que pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. Esses receptores são designados como DP para PGD₂, EP1, EP2, EP3 e EP4 para PGE₂, FP para PGF_{2α}, IP para PGI₂ e TP ou TBXA₂R para o TXA₂ (WANG; DUBOIS; RICHMOND, 2010). Esses mediadores possuem potentes atividades biológicas como regulação da resposta imune e inflamação, modulação da agregação plaquetária, participação na homeostase vascular e renal, participação nas funções uterinas e na implantação

do embrião, regulação do ciclo sono-vigília, regulação da temperatura corporal e proteção da mucosa gástrica (WANG; HONN; NIE, 2007).

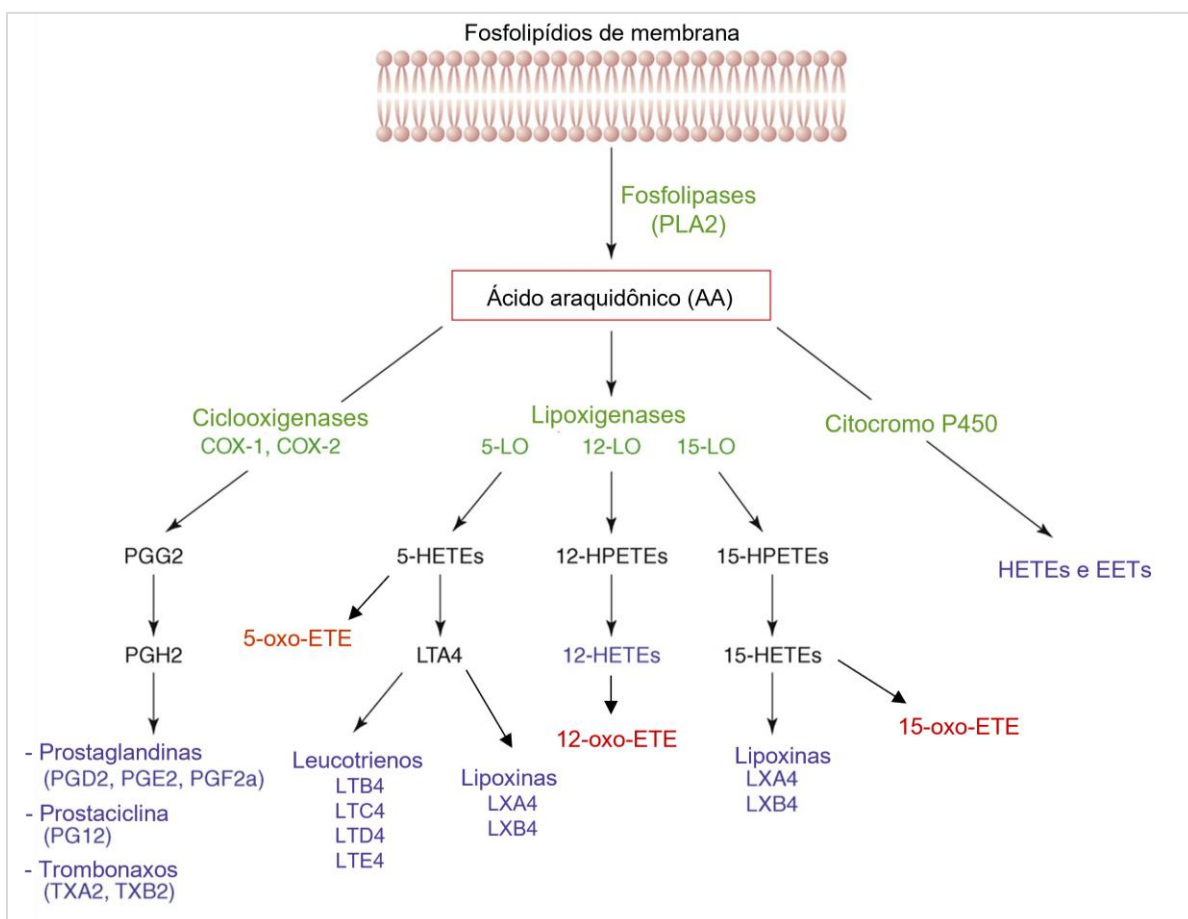


Figura 3: Vias de síntese dos eicosanoides. Os fosfolipídios de membrana são clivados pela fosfolipase A2 (PLA2) em ácido araquidônico (AA). O AA é metabolizado por três vias distintas para a produção de eicosanoides: a via das ciclooxygenases gerando prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos; a via das lipoxigenases produzindo leucotrienos, HETEs e lipoxinas; e a via do citocromo P450 formando EETs e HETEs. Fonte: adaptado de (HARIZI; CORCUFF; GUALDE, 2008).

A PGD2 está envolvida na vasodilatação e inibição da agregação plaquetária, maturação de mastócitos e recrutamento de basófilos e eosinófilos para resposta alérgica. A PGE2 tem funções na vasodilatação, febre, diminuição da produção de TNF- α e aumento de IL-10 nos macrófagos, aumento da liberação de neurotransmissores e nas contrações uterinas. A PGI2 inibe a agregação plaquetária e também diminui a expressão de TNF- α e aumenta IL-10. A PGF2 α tem ação

vasoconstritora e broncoconstritora, ação na contração dos músculos lisos e na contração uterina. Já o TXA₂ está envolvido na agregação plaquetária e tem funções vasoconstritora e broncoconstritora (HANNA; HAFEZ, 2018).

O papel desses mediadores lipídicos na regulação da progressão tumoral e metástase tem sido vinculado com a expressão de COX como enzima chave na produção dos prostanoídes (WANG; HONN; NIE, 2007). Há duas isoenzimas principais de COX: a COX-1 que é constitutivamente expressa em muitos tecidos e é responsável pelos níveis basais dos prostanoídes com funções homeostáticas; e a COX-2 que geralmente não é expressa em condições basais, mas é a isoforma induzida, ou seja, sua expressão está aumentada em resposta a estímulos pró-inflamatórios, fatores de crescimento e hormônios (CHEN; YANG; GROSSER, 2013). Nos cânceres, os níveis elevados de PGs estão associados com a expressão aumentada de COX-2, sobretudo, no câncer de cólon (HOWE, 2007).

No câncer de mama também é documentado o aumento da expressão de COX-2, o que está relacionado a um pior prognóstico (KOBAYASHI; OMORI; MURATA, 2018). Entre os prostanoídes, a PGE₂ é a prostaglandina mais encontrada no microambiente tumoral e sua expressão está relacionada com o crescimento do tumor, metástase, angiogênese e resistência à apoptose (KOCHEL; GOLOUBEVA; FULTON, 2016; WANG; DUBOIS; RICHMOND, 2010). A PGE₂ diminui a expressão de citocinas Th1, aumenta a expressão de citocinas Th2 e aumenta a atividade de células Treg e MDSCs (FINETTI et al., 2020).

Além disso, a produção de PGE₂ tanto pelas células tumorais quanto pelas células do estroma, aumenta a expressão da aromatase, uma enzima pertencente ao grupo do citocromo P450, que está envolvida na produção de estrógeno e é extremamente relevante na carcinogênese da mama (HOWE, 2007). Já o papel das outras PGs no microambiente tumoral é menos relatado na literatura. A PGD₂ inibe a hiperpermeabilidade e angiogênese, aumenta a expressão de IL-13 pelas células linfoides da inata tipo 2 (ILC2) e suprime a imunidade anti-tumoral pela ativação de ILC2. E a PGI₂ induz a migração celular de células endoteliais (KOBAYASHI; OMORI; MURATA, 2018).

O TXA₂ tem ações na modulação da angiogênese durante o crescimento do tumor e a inflamação crônica. Está envolvido na neovascularização induzida por angiotensina II. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) estimulam a migração de células

endoteliais em resposta à expressão de TXA₂ (NAKAHATA, 2008). Li e Tai (2013) mostraram que o TXA₂ estimula as células tumorais, que apresentam alta expressão de TP, a liberarem a quimiocina MCP-1 (CCL2), recrutando macrófagos que promoveram a invasão de células neoplásicas de pulmão ((LI; TAI, 2013).

As lipoxigenases (LOXs) são nomeadas de acordo com a posição que inserem uma molécula de oxigênio no AA. Os principais locais de oxidação ocorrem nas posições 5, 12 e 15 da molécula de AA e essas reações são catalisadas, respectivamente, pelas enzimas 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX (POWELL; ROKACH, 2015). Nesta via são produzidos os leucotrienos (LTs), os ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETEs), as lipoxinas (LXs) e as hepoxilinas (HOs) que estão envolvidos em reações alérgicas, inflamação, broncoconstrição e vasoconstrição (BORIN et al., 2017).

A principal via da lipoxigenase envolvida no metabolismo do AA é a da 5-LOX. A enzima inicia a sua ação na presença da proteína ativadora de 5-LOX (FLAP), convertendo o AA num hidroperóxido intermediário denominado de ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) (GOMES; SOUZA; COLQUHOUN, 2018). 5HPETE é rapidamente convertido no ácido 5-hidroieicosatetraenoico (5-HETE) ou hidrolisado no leucotrieno instável, o LTA₄ (WANG; DUBOIS; RICHMOND, 2010). Esse pode sofrer ação da LTA₄ hidrolase e ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou da LTC₄ sintase para formar leucotrieno C₄ (LTC₄). LTC₄ é metabolizado pela γ-glutamil-transpeptidase em LTD₄ que é convertido em LTE₄ por cisteinil-glicinase (BENNETT; GILROY, 2016).

Os leucotrienos exercem suas funções através de receptores acoplados à proteína G. LTB₄ pode se ligar a dois receptores: BLT1 com maior afinidade e BLT2 com menor afinidade. E LTC₄ e LTD₄ podem se ligar aos receptores: CysLT1 com maior afinidade e CysLT2 com menor afinidade. BLT1 e CysLT1 são expressos exclusivamente nos neutrófilos e BLT2 e CysLT2 são expressos em uma variedade de células (WANG; DUBOIS; RICHMOND, 2010).

LTC₄, LTD₄ e LTE₄ são potentes mediadores da resposta alérgica e LTB₄ é potente quimioatrator de neutrófilo e eosinófilos (BENNETT; GILROY, 2016). No microambiente tumoral, LTB₄ é produzido por macrófagos associados aos tumores (TAMs) é importante para o recrutamento de células T. Porém, células tumorais apoptóticas induzem a redução de 5-LOX nos TAMs, diminuindo o recrutamento de células T efectoras e, consequentemente, induzindo a progressão tumoral. Ainda,

LTB4 ativa PPAR α em células B, promove geração de células B reguladoras (Breg) e promove metástase no câncer de mama (JOHNSON; KLECZKO; NEMENOFF, 2020).

Os HETEs são formados principalmente pela via das lipoxigenases, mas também podem ser produzidos pelas COXs e a via do citocromo P450. Posteriormente, esses lipídios servem como substrato para a formação dos ácidos oxoeicosatetraenoicos (oxo-ETEs). 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE e 15-HETE são formados pelas 5-, 8-, 12- e 15-LOX.

5-HETE tem efeitos similares aos leucotrienos, atuando como potente quimioatrator de neutrófilos e outros leucócitos, modulando a adesão, migração e degranulação dessas células. Entretanto, 5-oxo-ETE parece ser mais potente que 5-HETE nos neutrófilos (GOMES; SOUZA; COLQUHOUN, 2018). No câncer, esses mediadores lipídicos parecem estar envolvidos na regulação da sobrevivência celular. Ghosh e Myers demonstraram que a inibição de 5-LOX com MK886 em linhagens celulares de câncer de próstata resultou em apoptose. Porém, quando adicionados 5-HETE e 5-oxo-ETE nas células, os EICs bloquearam a ação de MK886 e induziram a proliferação celular (GHOSH; MYERS, 1998).

12-LOX e 12-HETE foram descobertos primeiramente nas plaquetas. 12-HETE parece estar envolvido na função plaquetária, induzindo a expressão da molécula de adesão P-selectina, contribuindo para a trombogênese (POWELL; ROKACH, 2015). No microambiente tumoral, 12-HETE tem função pró-tumoral devido seus efeitos tanto nas células tumorais quanto nas células endoteliais, e é fortemente correlacionado à metástase. Esse EIC induz o rearranjo do citoesqueleto de células tumorais dependente de proteína quinase C (PKC), resultando no aumento da motilidade dessas células e induz a liberação de catepsina B pelas células tumorais, degradando a membrana basal subendotelial e promovendo metástase pela passagem dessas células para a corrente sanguínea (POWELL; ROKACH, 2015). Já a função biológica de 12-oxo-ETE é menos descrita.

15-LOX possui duas isoformas: 15-LOX-1 e 15-LOX-2. Ambas podem usar como substrato o AA ou o ácido linoleico (AL). A 15-LOX-1 tem maior afinidade pelo AL formando o ácido 13-hidroxiotetradecadienoico (13-HODE), enquanto 15-LOX-2 tem maior afinidade pelo AA formando 15-HETE. Porém, as duas enzimas podem formar os dois produtos. 13-HODE tem sido correlacionado com função protetora em doenças inflamatórias e 15-HETE está associado ao processo inflamatório e

angiogênese (GOMES; SOUZA; COLQUHOUN, 2018). No câncer, o papel desses EICs parece ser ambíguo e depende do tipo de tumor (BORIN et al., 2017). 15-HETE parece ter um papel protetor no câncer de próstata, inibindo a progressão do ciclo celular e reduzindo a proliferação, porém promove a angiogênese e pode favorecer o crescimento do tumor. Já 15-oxo-EETE tem sido relacionado como inibidor da proliferação de células endoteliais e pode ter papel antiangiogênico (POWELL; ROKACH, 2015).

8-HETE e 11-HETE são associados às atividades anti-mitogênicas e antitumorais (GREENE et al., 2011). No trabalho de Kim et al., 8-LOX foi associada com a diferenciação de queratinócitos e os autores demonstraram que a expressão forçada da enzima inibiu a tumorigênese de pele em camundongos. Schweiger et al. (2007), em trabalho semelhante, os autores também demonstraram que a expressão forçada de 8-LOX inibiu o crescimento de queratinócitos pré-malignos de camundongos. Entretanto, no trabalho de Hada et al., os autores associaram 8-HETE com um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de ovário (HADA et al., 2019; KIM et al., 2005; SCHWEIGER; FÜRSTENBERGER; KRIEG, 2007).

Já Pickens et al, demonstraram concentrações aumentadas de 11-HETE em pólipos do cólon de pacientes com adenoma e pólipos hiperplásicos. Os autores referiram que pode ser devido a geração desse HETE pela COX e pode ter funções no microambiente tumoral, favorecendo o crescimento celular proliferação e metástases. Por outro lado, os autores também relataram que 11-HETE é um marcador de peroxidação lipídica, e o aumento desse lipídio no plasma pode ser um indicativo de estresse oxidativo e aumento de espécies reativas de oxigênio (PICKENS et al., 2019).

2.4.2. Esfingolipídios

Os esfingolipídios são moléculas estruturais das membranas celulares que desempenham funções importantes na manutenção da função de barreira e fluidez das membranas (OGRETMEN, 2017). Porém, não somente como componentes estruturais, eles também atuam como moléculas sinalizadoras que participam de uma variedade de eventos celulares como na transdução de sinal, diferenciação e crescimento celular e apoptose (RAO et al., 2013).

Os esfingolipídios são estruturalmente caracterizados por uma base esfingoide de 18 carbonos, a esfingosina. Modificação nessa estrutura produz uma diversidade de espécies lipídicas, dentre as quais, a ceramida (Cer) ocupa um papel central nessa via metabólica e é um precursor chave para a formação de esfingolipídios complexos via síntese *de novo* ou através de rotas de recuperação (RAO et al., 2013).

A síntese *de novo* da ceramida inicia com a condensação de uma serina com palmitoil CoA pela enzima serina palmitoiltransferase (SPT), formando 3-cetoesfinganina. Essa molécula, pela ação de uma redutase, é convertida à esfinganina. Em seguida, pela enzima ceramida sintase (CERS1-6), esfinganina é acilada em diidroceramida. Esta sofre dessaturação, pela diidroceramida dessaturase (DES), e é convertida em ceramida. Essa primeira fase do metabolismo ocorre no citosol do retículo endoplasmático. Posteriormente, a ceramida é transportada para o complexo de Golgi, onde servirá como substrato para a produção dos esfingolipídios complexos como esfingomielina (SM) e glicosfingolipídios (KNAPP et al., 2019).

A Cer pode ser convertida em esfingomielina pela sintase de esfingomielina (SMS), em galactosilceramida (GalCer) pela galactosilceramida sintase (GalCerS) ou ainda em glicosilceramida (GlcCer) pela glicosilceramida sintase (GCS), a a qual vai gerar lactosilceramida (LacCer), glicosfingolipídios ou gangliosídeos. A ceramida também pode ser convertida em ceramida-1-fosfato (C1P) pela enzima ceramida quinase (CERK) ou ser hidrolisada por ceramidases para formar esfingosina que é fosforilada por esfingosina quinase (SPHK) em esfingosina-1-fosfato (S1P) (GAULT; OBEID; HANNUN, 2010; OGRETMEN, 2017).

A síntese de Cer por ocorrer pela hidrólise de esfingomielinas, glicosilceramidas e galactosilceramidas pelas ações das esfingomielinase (SMase), glicosilceramidase (GlcCDase) e galactosilceramidase (GCDase), respectivamente. Ou ainda por rotas de recuperação que utilizam a reciclagem de esfingosina ou pela reciclagem de cadeias curtas exógenas de ceramida transformando-as em cadeias longas (OGRETMEN, 2017).

Os esfingolipídios desempenham papéis distintos no câncer. E nesse contexto, os principais lipídios envolvidos são a Cer e esfingosina que são pró-apoptóticas e C1P e S1P que promovem proliferação celular. Manter o equilíbrio nos níveis desses lipídios é importante para o funcionalmente normal das células.

Porém, é comum no desenvolvimento do câncer, uma superexpressão das enzimas que catabolizam a ceramida, convertendo-a em esfingolipídios com propriedades proliferativas (SEDIĆ; GRBČIĆ; KRALJEVIĆ PAVELIĆ, 2019).

A Cer, devido seu papel central no metabolismo dos esfingolipídios, tem se tornado alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. O aumento dos níveis de Cer gerado pelo tratamento quimioterápicos tem sido proposto como um possível mecanismo pelo qual essas drogas exercem seus efeitos antitumorais. E o desenvolvimento de inibidores do catabolismo da Cer tem sido proposto como alvos farmacológicos na terapia anticâncer a fim de aumentar os níveis de ceramida no microambiente tumoral (BOOJAR; BOOJAR; GOLMOHAMMAD, 2018).

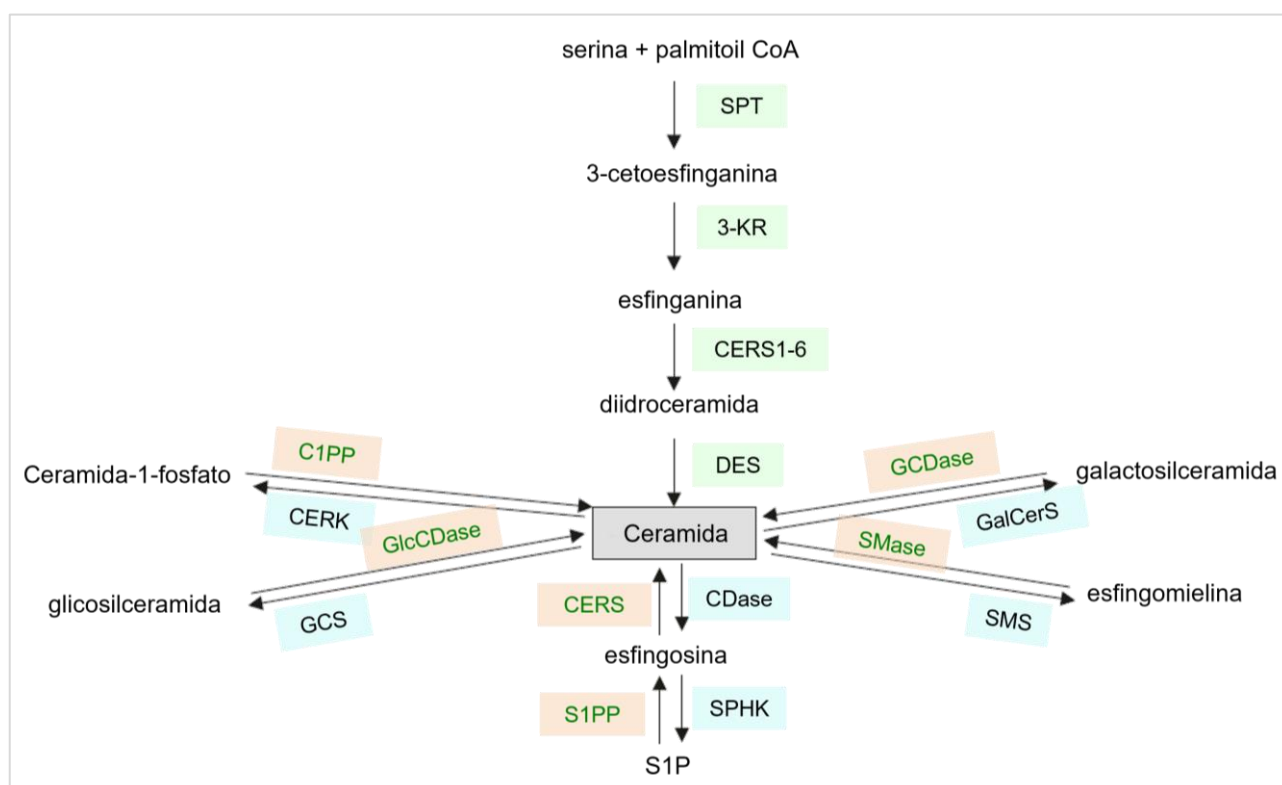


Figura 4: Metabolismo dos esfingolipídios. Síntese *de novo* da ceramida em verde: SPT, serina palmitoiltransferase; 3-KR, 3-cetoesfinganina redutase; CERS, ceramida sintase; DES, diidroceramida dessaturase. Catabolismo da ceramida em azul: SMS, esfingomielina sintase; GalCerS, galactosilceramida sintase; GCS, glicosilceramida sintase; CERK, ceramida quinase. Rotas de recuperação da ceramida em laranja: SMase, esfingomielinase; CDase, ceramidase; C1PP e S1PP, fosfatases de C1P e S1P; GlcCDase, glicosilceramidase; GCDase, galactosilceramidase. Fonte: adaptado de (KNAPP et al., 2019).

A esfingomielina (SM) é o principal esfingolípido constituinte das membranas celulares e seu papel no câncer tem sido investigado. Ryland et al. relatam que a adição exógena de SM pela dieta após a administração de gencitabina, aumentou os níveis de Cer e concomitantemente a morte de células pancreáticas. E a administração de SM em camundongos após o tratamento com análogos de ceramida também inibiu a proliferação de células cancerosas. Entretanto, não se sabe se o possível efeito antitumoral é devido a SM por si mesma ou por ela induzir a formação de Cer (RYLAND et al., 2011).

Por outro lado, Zheng et al. sugerem o papel pró-tumoral de SM devido a maior expressão de SMS2 em pacientes com câncer de mama metastático. Os níveis aumentados da enzima rompem a homeostase entre Cer e SM, suprimindo a expressão de Cer e aumentando a proliferação celular devido à inibição da apoptose. Os autores sugerem que o aumento de SM pela expressão aumentada de SMS2 conduz à ativação da via de sinalização de TGF- β /Smad que promove a transição epitélio-mesenquimal, aumenta a migração e o poder de invasão de células do câncer de mama (ZHENG et al., 2019).

A diidroceramida (dHCer), por muitos anos, recebeu pouca atenção, pois supostamente não tinha atividade biológica como molécula sinalizadora (RYLAND et al., 2011). Entretanto, alguns estudos reportam funções importantes das dHCers. Lachkar et al. relatam que o estresse oxidativo gerado em ambientes de hipóxia aumenta os níveis de dHCer e diminui os níveis de Cer. E Stiban et al., reportam que as dHCers inibem a formação nas membranas mitocondriais de canais induzidos pela Cer para indução da apoptose, sugerindo um papel antiapoptótico para as dHCers (LACHKAR et al., 2020; STIBAN; FISTERE; COLOMBINI, 2006).

Já os glicoesfingolípidios, GlcCer e GalCer têm sido reportados com níveis elevados em alguns tipos de câncer (RYLAND et al., 2011). No câncer de mama, a GalCerS é uma das enzimas que está com seus níveis elevados e esse fenômeno foi correlacionado com o risco aumentado de metástase pulmonar nesses pacientes. Também foi reportado maiores níveis da enzima em tumores de mama que metastatizaram para o pulmão do que nos tumores primários, relacionando esse esfingolípido com fenótipo mais agressivo da doença. Os níveis de GCS têm sido reportados como aumentados nos tecidos tumorais que nos tecidos normais, e têm sido correlacionados com a progressão do câncer de mama, de ovário e leucemia.

Além disso, a superexpressão de GCS e consequente aumento de GlcCer foi relacionado com resistência à droga em células cancerosas (LIU; LI, 2013).

As LacCers têm sido implicadas na proliferação, adesão e migração celular e na angiogênese. Esses esfingolípídios induzem a geração de espécies reativas de oxigênio, aumentando o estresse oxidativo e consequentemente ativando vias de sinalização inflamatórias (CHATTERJEE; BALRAM; LI, 2021).

No câncer de mama, Nagahashi et al. reportaram níveis aumentados de espécies de Cer, esfingosinas, S1P, SM e HexCer nos tumores mamários em comparação com tecidos normais adjacentes. Moro et al., em trabalho semelhante, demonstraram níveis elevados de Cer, SM, Hexcer e dH nos tecidos tumorais de mama que nos tecidos normais. Já Bhadwal et al. demonstraram níveis aumentados de C1P e S1P, porém níveis diminuídos de algumas espécies de SM nos tumores mamários que no tecido normal (BHADWAL et al., 2020; MORO et al., 2018; NAGAHASHI et al., 2016).

2.5. Biomarcadores lipídicos no câncer de mama

Um biomarcador é uma característica ou condição que pode ser mensurada como indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta a uma exposição ou intervenção. Pode ser derivado de características fisiológicas, histológicas, radiográficas, moleculares ou ainda de intervenções terapêuticas (CALIFF, 2018).

Os biomarcadores podem ser classificados de acordo com as suas características em biomarcadores por imagem (tomografia computadorizada, ressonância magnética) ou biomarcadores moleculares baseados em ácidos nucléicos, peptídeos, proteínas, metabólitos lipídicos e outras moléculas pequenas (HUSS, 2015). Ainda, os biomarcadores também podem ser classificados baseado na sua aplicação em biomarcadores: antecedentes, de screening, de diagnóstico, de estadiamento, prognósticos, preditivos e farmacodinâmicos (CHEN; HUANG; KERR, 2011; HUSS, 2015).

Os biomarcadores antecedentes indicam o risco de desenvolver uma doença como os testes genéticos, por exemplo (PUNTMANN, 2009). Os de screening servem para monitorar a doença subclínica (CHEN; HUANG; KERR, 2011). Os biomarcadores diagnósticos detectam e confirmam a presença de uma doença ou

condição (CALIFF, 2018). Os biomarcadores preditivos indicam o provável efeito de um determinado tratamento, auxiliando na escolha da terapia (HUSS, 2015). Os biomarcadores prognósticos informam sobre a progressão, recorrência e desfecho da doença (BALLMAN, 2015). Os biomarcadores de estadiamento categorizam a severidade da doença (CHEN; HUANG; KERR, 2011). E os biomarcadores farmacodinâmicos indicam mudanças em resposta a determinada terapia (CALIFF, 2018).

No câncer, o desenvolvimento de biomarcadores moleculares requer um bom entendimento dos genes envolvidos na carcinogênese e a identificação de novas moléculas ou vias que estão desreguladas durante o desenvolvimento da doença. Esses biomarcadores devem ser capazes de distinguir os eventos entre exposição e doença e mudanças em seus níveis devem ser relacionadas com mudanças na doença (NAIR; SANDHU; SHARMA, 2014).

Vários estudos têm investigado biomarcadores proteicos ou de ácidos nucleicos. Entretanto, há um crescente interesse em investigar lipídios que estejam associados com o câncer de mama, dado que durante o desenvolvimento da doença o metabolismo de lipídios está desregulado no microambiente tumoral (FICHTALI et al., 2020; MISTRY; FRENCH, 2016).

Na área do câncer de mama, alguns estudos vêm abordando a lipidômica como ferramenta para identificar alterações no metabolismo de lipídios no microambiente tumoral e investigar possíveis biomarcadores. Chen et al. e Tan et al. investigaram potenciais biomarcadores lipídicos no plasma de pacientes com câncer de mama e demonstraram aumento principalmente de espécies de ácidos graxos livres e fosfolipídios nas amostras desses pacientes. Kim et al. e Eghlimi et al. identificaram espécies de fosfolipídios como biomarcadores para o subtipo HER-2 e triplo-negativo, respectivamente. Em outro estudo, Jiang et al. reportaram diferenças na expressão de fosfolipídios séricos entre os subtipos de câncer de mama (CHEN et al., 2016; EGHLIMI et al., 2020; JIANG et al., 2017; KIM et al., 2013; TAN et al., 2020).

Bhadwal et al. identificaram espécies de C1P, S1P e SM como possíveis biomarcadores preditivos para o câncer de mama. Hilvo et al. (2014) demonstraram níveis diminuídos de triacilgliceróis, principalmente daqueles que continham ácido oleico C18:1, após tratamento com quimioterapia neoadjuvante. Os autores associaram esses lipídios como uma resposta patológica completa. Em estudo

semelhante, Wei et al. demonstraram níveis séricos diminuídos de ácido linoleico em pacientes com câncer de mama após tratamento neoadjuvante (BHADWAL et al., 2020; HILVO et al., 2014; WEI et al., 2013).

2.6. Abordagem lipidômica

A lipidômica é uma área dentro da metabolômica que tem por objetivo identificar e quantificar todos os lipídios, caracterizar suas interações com outros lipídios e proteínas, além de avaliar a expressão de proteínas e genes relacionados ao metabolismo lipídico (ZHAO et al., 2015). O estudo do lipidoma implica na investigação de biomarcadores lipídicos que podem ser úteis no diagnóstico, na caracterização do prognóstico e na predição de terapias, bem como no desenvolvimento de novas fontes terapêuticas (PERROTTI et al., 2016).

A identificação e quantificação dos lipídios podem ser de forma dirigida, na qual há a caracterização de classes específicas de lipídios. Esta abordagem é conhecida como lipidômica dirigida (*targeted lipidomic*, do inglês) e é direcionada a problemas biológicos complexos e específicos. De outro modo, o estudo dos lipídios pode ser de forma global (*untargeted lipidomic*), na qual há identificação de todas as espécies lipídicas presentes em um determinado sistema (HU; ZHANG, 2018). Para isso, a lipidômica dispõe de muitas tecnologias modernas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fluorescência, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (MS). Entretanto, a MS tem sido amplamente utilizada na lipidômica devido ao desenvolvimento de novos instrumentos e técnicas, propiciando um progresso nesse campo de pesquisa (WANG et al., 2016).

A lipidômica baseada em MS pode ser classificada em duas categorias: uma baseada na infusão direta dos lipídios ao espectrômetro de massas e a outra é baseada na MS acoplada à cromatografia líquida (HU; WANG; HAN, 2017). A infusão direta do extrato lipídico ao MS para análise é também denominada de *shotgun* e é um processo reprodutível com menor gasto de tempo. A desvantagem está na dificuldade de operar automaticamente, necessitando de outras tecnologias que poderão aumentar o custo do processo. Já o método analítico em que há o emprego da cromatografia líquida tem a vantagem de aumentar a capacidade de separação das moléculas, reduzindo os efeitos de matriz, separando isômeros e

enriquecendo os lipídios de pouca abundância. Essa técnica é recomendada para análise de amostras biológicas complexas (HU; ZHANG, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

No câncer de mama, os receptores de estrógeno (ER), de progesterona (PR) e de HER-2 têm sido estabelecidos como biomarcadores moleculares, avaliados no diagnóstico para identificar o subtipo do tumor e auxiliar na predição do prognóstico e do tratamento sistêmico (PATANI; MARTIN; DOWSETT, 2013). Entretanto, apesar de sua grande utilidade, a detecção dos receptores hormonais, que estão superexpressos na maioria dos casos, é limitada à biópsia ou à peça cirúrgica (DUFFY et al., 2017; WAHID, 2017), assim como as plataformas de testes genéticos como Oncotype DX e MammaPrint que mensuram a expressão de grupos de genes relacionados ao câncer através de amostras do tecido tumoral (NICOLINI; FERRARI; DUFFY, 2018).

Alguns biomarcadores sanguíneos como CA15-3 e CA 27.29 são utilizados no monitoramento do câncer de mama, mas têm baixa sensibilidade (JIANG et al., 2017). A carência de biomarcadores sanguíneos sensíveis e específicos durante o monitoramento do tratamento e no acompanhamento pós-cirúrgico torna necessária a busca por novos biomarcadores como preditores de recorrência ou metástase (SISLER et al., 2016). Desse modo, inúmeras pesquisas têm investido na descoberta de biomarcadores, principalmente após o avanço tecnológico no campo das ômicas (metabolômica, genômica, proteômica, lipidômica) que passou a oferecer diversas ferramentas para análise de inúmeras moléculas (NAIR; SANDHU; SHARMA, 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar potenciais biomarcadores lipídicos para o câncer de mama para que sejam úteis no diagnóstico, na predição do prognóstico e/ou no monitoramento do tratamento com alta precisão, sensibilidade e especificidade.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Identificar possíveis biomarcadores lipídicos preditivos para o câncer de mama, avaliando a influência da IL-17 na modulação do metabolismo lipídico.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar o perfil clínico e sociodemográfico dos pacientes;
- Mensurar as concentrações de citocinas e quimionas no microambiente tumoral;
- Identificar e quantificar as concentrações de eicosanoides e esfingolipídios nos tumores mamários e no sangue periférico;
- Avaliar a influência da IL-17 na modulação do metabolismo dos mediadores lipídicos;
- Analisar a força de representação das espécies lipídicas como potenciais biomarcadores para o câncer e mama.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo que analisou o perfil epidemiológico de pacientes com câncer de mama e pacientes controles através de variáveis sociodemográficas, clínicas e de risco. Além disso, analisou parâmetros imunológicos, metabólicos, histológicos e imunohistoquímicos.

5.2. População de Pacientes Oncológicos

5.2.1. Critérios de Inclusão

- Mulheres diagnosticadas com câncer de mama invasivo (cid: C50) pela primeira vez e atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON);
- Mulheres com indicação cirúrgica;

5.2.2. Critérios de Exclusão

- Mulheres que fizeram quimioterapia neoadjuvante.

5.2.3. Caracterização dos Grupos

As mulheres foram divididas em quatro grupos de acordo com os subtipos moleculares apresentados pela imunohistoquímica:

- Grupo A: pacientes que apresentaram o subtipo Luminal A.
- Grupo B: pacientes que apresentaram o subtipo Luminal B.
- Grupo C: pacientes que apresentaram a superexpressão de HER-2.

5.3. População de Pacientes Controles

Mulheres saudáveis sem histórico pessoal de câncer de mama e que realizaram procedimentos estéticos de mamoplastia redutora e/ou mastopexia. As pacientes compuseram um único grupo o qual foi denominado de grupo controle.

5.4. Tamanho Amostral

Considerando o número médio de novos casos de câncer de mama na FCECON entre os anos de 2011 a 2017 que foi de 140 (FCECON, 2017).

Considerando o tipo de estudo (coorte prospectivo) que dependia do acompanhamento das pacientes oncológicas e que há uma perda de seguimento 1 ano após a cirurgia. Considerando que os ensaios analíticos são de alto custo.

Para este estudo foi proposto um N amostral de 30 mulheres com câncer de mama, sendo 10 mulheres de cada subtipo para serem divididas nos grupos A, B e C. Também foi proposto um N amostral de 10 mulheres para compor o grupo controle.

5.5. Local do Estudo

Este projeto é uma parceria entre o Grupo de Pesquisa Bases Biológicas e Moleculares das Neoplasias da FCECON e o Grupo de Estudos em Biotecnologia e Imunoquímica de Lipídios (GeBIL) vinculado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) da Universidade de São Paulo.

A coleta de dados e de amostras das pacientes oncológicas foram realizadas na FCECON e das pacientes controles foram realizadas nos Hospitais Particulares de Manaus Santo Alberto, Santa Júlia e Beneficente Portuguesa. Já os ensaios analíticos foram realizados no laboratório Multiusuário Centro de Excelência para Quantificação e Identificação de Lipídios (CEQIL), na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

5.6. Procedimento de abordagem às pacientes para coleta de dados

A busca pelas pacientes oncológicas realizou-se através do mapa cirúrgico semanal e do mapa diário de internação da FCECON, observando as indicações cirúrgicas. Os mapas também forneceram os números dos prontuários, os quais foram consultados para identificar o laudo histopatológico e o painel imunohistoquímico. Com essas informações preliminares, as pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão foram abordadas de forma humanizada nas enfermarias durante a internação pré-cirúrgica, receberam explicação sobre o objetivo do projeto, seus riscos e benefícios e foram convidadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A). Neste momento também responderam ao formulário de coleta de dados (Apêndice C) e foram realizadas as medidas antropométricas de peso (balança digital portátil) e altura (trena).

Já as pacientes do grupo controle foram recrutadas em parceria com o cirurgião plástico Dr. Elizeu Lavor e sua equipe. Um dia antes da cirurgia foi feito contato telefônico para apresentar o projeto. Em caso de interesse em participar do estudo, na enfermaria, antes da cirurgia, as pacientes foram abordadas de forma humanizada, assinaram o TCLE (Apêndice B), responderam ao formulário de coleta de dados e mensuram peso e altura.

5.7. Coleta de Amostras dos Pacientes

5.7.1. Coleta de Sangue

A coleta foi realizada no dia da cirurgia, antes da mesma, devido ao estado de jejum dos pacientes. Foi coletado sangue total em tubos de coleta sem anticoagulantes para obtenção de soro, o qual foi fracionado para as dosagens de citocinas e quimiocinas e para as análises de lipidômica. As amostras foram congeladas primeiramente em freezer -20° C no Laboratório de Biologia Molecular da FCECON e, posteriormente, foram transportadas em caixas térmicas e armazenadas em freezer -80° C no Laboratório de Genômica (LabGen) da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM.

5.7.2. Coleta de tecidos

Para a coleta de tecido foi feito um acordo entre a equipe cirúrgica (mastologistas, enfermeiros e técnicos) e a equipe do projeto (doutoranda e médicos patologistas colaboradores) da FCECON. Na rotina do centro cirúrgico o recomendado é armazenar todas as peças cirúrgicas em formol e enviá-las para o Laboratório de Anatomia Patológica (LAP). Entretanto, as análises deste projeto necessitaram de tecidos frescos sem contato com formol.

Para solucionar esse problema, as cirurgias de mastectomia simples ou radical e as cirurgias de setorectomia foram acompanhadas individualmente. A peça cirúrgica retirada foi transportada pela doutoranda até o LAP seguindo todos os protocolos exigidos pelos setores envolvidos. No LAP, o médico patologista realizou a clivagem da peça e forneceu os fragmentos de tecido necessários para o projeto sem que houvesse comprometimento das peças para análises futuras de histopatologia e imunohistoquímica.

Durante a clivagem da peça foram obtidos 4 (quatro) fragmentos do tumor: dois para as análises de lipidômica, um para dosagem de mediadores solúveis e o último para expressão gênica. Também foram obtidos outros três fragmentos: um de tecido normal que foi retirado da região mais distante da lesão tumoral; outro da margem da lesão; e por fim, um fragmento de linfonodo correlato quando identificado a fresco.

Com exceção do fragmento utilizado para análise de expressão gênica que foi acondicionado em eppendorf contendo solução de RNAlater (Sigma-Aldrich®), os outros fragmentos foram acondicionados em eppendorfs secos e todos foram congelados imediatamente, semelhante ao ocorrido com as amostras de soro.

Ao final de todas as coletas, as amostras foram transportadas, por empresa referenciada, em gelo seco até o CEQIL- FCFRP -USP em Ribeirão Preto, seguindo os protocolos de transporte IATA (International Air Transport Association).

5.8. Ensaios Analíticos

5.8.1. Preparo e processamento dos tecidos

Os fragmentos de tecido destinados para quantificação de citocinas foram pesados e neles adicionados uma solução de inibidor de protease (Thermo®) na proporção: 1 mL da solução de IP para cada 100mg de tecido. As amostras foram cortadas em pedaços menores com tesoura cirúrgica e posteriormente foram maceradas no Ultra-Turrax (IKA® T10 basic). O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm a 4°C durante 10 minutos em microcentrífuga refrigerada (Axyspin - AXYGEN®). O sobrenadante foi aliquotado e congelado a -80°C.

Para os tecidos destinados à extração de lipídios foram adicionados volume de metanol grau HPLC na seguinte proporção: para cada 100 mg de tecido, 1 mL de metanol. Após maceração, conforme descrito acima, as amostras foram homogeneizadas em vórtex (IKA® Lab dancer) e aliquotadas para cada ensaio: 150 µL do homogenato total para esfingolipídios e 200 µL para lipídios totais. O restante do homogenato foi centrifugado e o sobrenadante gerado foi aliquotado 250 µL para extração de eicosanoides.

5.8.2. Dosagem de mediadores inflamatórios solúveis

As dosagens de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foram realizadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems – Duo Kit). Para este ensaio foram utilizados o tampão de bloqueio constituído de albumina sérica bovina (BSA) a 1% e o tampão de lavagem constituído de solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x) e Tween a 0,05%. No primeiro dia do ensaio, as placas de ELISA foram revestidas com 100 uL de anticorpo primário/ captura. No segundo dia, o conteúdo das placas foi retirado e as placas foram lavadas vezes com 300 uL tampão de lavagem. Após, foram adicionados 200 uL de tampão bloqueio por 1 hora, e posteriormente as placas foram lavadas e adicionadas 50 uL de amostras ou curva padrão de cada citocina ou quimiocina. Após duas horas de incubação, as placas foram lavadas e adicionados 100 uL de anticorpo secundário/ detecção. Após duas horas, as placas foram lavadas e adicionados 100 uL de enzima estreptavidina-peroxidase (R&D Systems). Após 20 minutos, as placas foram lavadas e adicionados 200 uL de solução reveladora TMB (BD Biosciences). Após 10 minutos foram adicionados 50 uL de solução de parada da reação (ácido sulfúrico 1N). A leitura das placas (96 poços - Costar) foi realizada em fluorímetro (Molecular Devices, EUA) a 450 nm. As concentrações das amostras foram calculadas automaticamente pelo software (SpectraMAX™) do equipamento, utilizando a curva do padrão de cada analito.

5.8.3. Extração de amostras em fase sólida (SPE) para eicosanoides

Foram utilizados como padrões internos os seguintes eicosanoides deuterados: TXB₂-d₄; 6-keto-PG1 α -d₄, PGE₂-d₄, PGD₂-d₄, PGF₂ α -d₄, 12-HETE-d₈, RVD1-d₅, 15-HETE-d₈, 5-oxo-ETE-d₇, LTC₄-d₅, 12-epi-LTB₄-d₄, LXA₄-d₅, DHA-d₅, LTE₄-d₅, eicosapentanoic acid-d₅ e 11,12-EET-d₁₁ (100 ug/mL - Cayman Chemicals, EUA).

Para a extração desses lipídios foi utilizado um sistema gerador de vácuo (vacuum manifold WATERS®), no qual foram acopladas as colunas de extração C18 (HyperSep SPE – Thermo Scientific®) juntamente com corpos de seringas. A cada adição de solvente o sistema foi aberto e fechado após o término da eluição. A metodologia foi adaptada de (GALVÃO et al., 2016).

Antes de iniciar o processo foram adicionados 10 μ L da solução de padrão interno (PI) nas amostras de tecido para correção da eficiência de extração durante

o processo. A primeira etapa da extração consistiu no condicionamento das colunas SPE com 2 mL de metanol grau HPLC (Merck) e em seguida com 2 mL de água ultrapura (MiliQ- Millipore, EUA) acidificada com ácido acético a 0,1% (v/v). Posteriormente foram adicionados nas colunas as amostras biológicas na seguinte preparação: 250 µL de amostras diluídas em 2,5 mL de água para obter concentração final de metanol de 10% (v/v). As amostras foram eluídas lentamente pelas colunas. O conjunto coluna e corpo da seringa foi lavado com 2 mL de água acidificada com 0,1% de ácido acético. Na sequência, o corpo da seringa foi desacoplado do sistema, e as colunas foram lavadas novamente com 1mL de água com 0,1% de ácido acético. Então, os EICs adsorvidos nas colunas foram eluídos com 1 mL de metanol com ácido acético a 0,1%.

Para extração de EICs do soro foram utilizados também 250 µL de amostra. Porém, após adição do padrão interno, 1mL de metanol gelado foi adicionado nas amostras para precipitação de proteínas. Posteriormente, o soro desnaturado foi centrifugado a 12.000 rpm à 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante obtido foi utilizado para a extração.

Após a última fase de eluição da coluna, as amostras foram secadas em concentrador a vácuo (Concentrator plus – Eppendorf®) e foram ressuspensas em 100 µL (tecido) e 50 µL (soro) de metanol: água ultrapura na proporção 7:3 (v/v). Após, as amostras foram agitadas em vórtex (Global Trade Technology) durante 10 minutos, centrifugadas novamente a 12.000 rpm à 4°C por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para os vials de injeção do HPLC.

5.8.4. Extração líquido-líquido para esfingolipídios

Previamente foram adicionados nas amostras 10 µL do mix de padrão interno constituído de ceramida C17:0 e esfingomielina SM(d18:1/12:0) (200 ug/mL). Para a extração de esfingolipídios do tecido foram utilizados 150 µL do homogenato em metanol; para amostras de soro foram utilizadas 250 uL, e nestes foram adicionados 250 µL de tampão salino PBS 1x, 150 µL de ácido clorídrico (6N), 250 µL de metanol e 1mL de clorofórmio. Então, as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos na frequência de 10Hz no aparelho Bead Ruptor 96 (Omni Internacional, EUA) e posteriormente centrifugadas à 12.000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica inferior foi transferida para um novo tubo. Na fase aquosa remanescente foi adicionado mais 1 mL de clorofórmio para re-extração com as etapas semelhantes as descritas na

primeira extração. As fases orgânicas extraídas foram submetidas ao processo de secagem em concentrador *Sped Vac* (Eppendorf, EUA) e posteriormente ressuspendidas em 100 µL (tecido) e 50 µL(soro) de metanol: clorofórmio (4:1, v/v). Depois, as amostras foram agitadas por 10 minutos, centrifugadas a 12.000 rpm por 7 minutos à 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para os vials de injeção no HPLC.

5.8.5. Identificação e Quantificação de Eicosanoides

A análise dos mediadores lipídicos foi feita em sistema LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), empregando o equipamento HPLC Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, HO, JP) com sistema de bomba binária e injetor automático acoplado ao espectrômetro de massas Triple - TOF 5600+ com fonte de ionização por ESI Turbo V (Sciex, Foster, CA, USA), situado no laboratório Multiusuário CEQIL da FCFRP/ FFCLRP – USP.

Foi utilizada coluna cromatográfica de fase estacionária C18 Ascentis Express (Sulpeco – St. Louis, MO, EUA) de dimensões 100 mm x 46 mm, 2.7 µm. O volume de 10 µL de cada amostra foi introduzido ao sistema com uso de um auto-injetor e a eluição da mesma foi realizada utilizando sistema de gradiente binário, constituído de fase móvel “A” composta por água/ acetonitrila/ ácido acético (70:30:0,02, v/v/v), e fase “B” composta por acetonitrila/ isopropanol (70:30, v/v), de acordo com o seguinte gradiente: 0% de B em 0 a 2 min, 15% de B de 2 a 5 min, 20% de B de 5 a 8 min, 35% de B de 8 a 11 min, 70% de B de 11 a 15 min, 100% de B de 15 a 19 min, 0% de B em 20 min, mantendo esta proporção até 25 min com fluxo de 0,6 mL/min. A fonte de ionização operou no modo negativo por varredura MRM^{HR} (monitoramento de reações múltiplas em alta resolução) para a identificação e quantificação, como demonstrado por (SORGI et al., 2018).

Tabela 4: Eicosanoides que foram investigados no estudo e em verde os que foram detectados nas amostras.

20-OH-LTB4	PGE2	15-deoxy-PGJ2
LTC4	PGF2a	5-HETE
PGB2	LTB4	5-oxo-ETE
15-keto-PGE2	LTD4	12-HETE
20-OH-PGE2	LTE4	8-HETE
TXB2	6-trans-LTB4	11-HETE
LXA4	PDx	12-oxo-ETE
PGD2	Maresin	15-oxo-ETE
6-keto-PGF1a	PGJ2/PGA2	15-HETE

5.8.6. Identificação e Quantificação de Esfingolipídios

A análise dos esfingolipídios foi realizada utilizando o mesmo sistema LC-MS/MS. Para tal, foi utilizado uma coluna cromatográfica C18 que foi mantida a 35°C durante todo o processo. A coluna foi equilibrada por 5 minutos com metanol 30% e ácido fórmico 70% (em água ultrapura, v/v), seguida pela injeção de 10 µL de cada amostra ao sistema com fluxo de 0,3 mL/min de acordo com o gradiente: 0.0-1 min – metanol 30%; 1,1-2,5 min – metanol 85%; 2,5-5,0 min – metanol 100%; 5,0-15 min mantém metanol 100%; 15,1-20 min reequilibra com metanol 30% e ácido fórmico 70%. As condições da fonte de ionização ESI e os parâmetros do gás foram: voltagem do íon spray 4.500 V; temperatura do aquecedor da fonte de ionização 450°C; gás de colisão – médio; gás da fonte de íons 1 - 30 psi; gás da fonte de íons 2 - 60 psi; e cortina de gás - 45 psi. A fonte de ionização operou no modo positivo por varredura MRM^{HR} (monitoramento de reações múltiplas em alta resolução) para a identificação e quantificação dos esfingolipídios.

Tabela 5: Espécies de esfingolipídios que foram investigadas no estudo e em verde os lipídios que foram detectadas nas amostras.

Cerâmidas	C16:0-Ceramida	Glicosilcerâmidas	C18:1_HexCer	Diidrocerâmidas	dHCer(d18:0/12:0)	Lactosilcerâmidas	LacCER(d18:0/24:1)
	C18:0-Ceramida		C20:1_HexCer		dHCer(d18:0/16:0)		LacCER(d18:1/24:1(15Z))
	C24:1-Ceramida		C20_HexCer		dHCer(d18:0/18:0)		LacCER(d18:0/26:1)
	C24:0-Ceramida		C22:1_HexCer		dHCer(d18:0/20:0)		LacCER(d18:1/26:1(17Z))
	C25:0-Ceramida		C22_HexCer		dHCer(d18:0/22:0)		LacCER(d18:1/18:1(9Z))
	C18:1 Cer		C23:1_HexCer		dHCer(d18:0/24:1(15Z))		LacCER(d18:0/18:1)
	C20 Cer		C23_HexCer		dHCer(d18:0/24:0)		LacCER(d18:0/22:0)
	C22 Cer		C24:2_HexCer		dHCer(d18:0/26:1(17Z))		LacCER(d18:1/22:0)
	C23:1 Cer		C24_HexCer		dHCer(d18:0/26:0)		LacCER(d18:0/20:0)
	C23 Cer		C25:1_HexCer		dHCer(d18:0/18:1)		LacCER(d18:1/20:0)
	C25:1 Cer		C25_HexCer		dHCer(d18:0/14:0)		LacCER(d18:0/26:0)
	C26:1 Cer		C26:2_HexCer		dHCer(d18:0/h24:0)		LacCER(d18:1/26:0)
	C26 Cer		C26:1_HexCer		dHCer(d18:0/h26:0)		LacCER(d18:0/16:0)
			C26_HexCer		dHCer(d18:0/h17:0)		LacCER(d14:1/16:0)
			C16_HexCer_OH		dHCer(d18:0/13:0)		LacCER(d18:0/18:0)
Esfingomielinas	SM_18:0	Glicosilcerâmidas	C18_HexCer_OH	Diidrocerâmidas	dHCer(d18:0/15:0)	Lactosilcerâmidas	LacCER(d14:0/18:0)
	SM_24:0		C20_HexCer_OH		dHCer(d18:0/17:0)		LacCER(d18:1/18:0)
	C14_SM		C22:1_HexCer_OH		dHCer(d20:0/16:0)		LacCER(d18:0/24:0)
	C16:1_SM		C22_HexCer_OH		dHCer(d20:0/18:0)		LacCER(d18:1/24:0)
	C16_SM		C23:1_HexCer_OH		dHCer(d20:0/20:0)		LacCER(d18:0/14:0)
	C18:1_SM		C23_HexCer_OH		dHCer(d20:0/22:0)		LacCER(d18:1/14:0)
	C20:1_SM		C24:1_HexCer_OH		dHCer(d20:0/24:0)	Esfingosinas	Sphingosina C18:0
	C20_SM		C24_HexCer_OH		dHCer(d20:0/26:0)		Sphingosina C16:0
	C22:1_SM		C25:1_HexCer_OH	Esfinganinas	Sphinganine C18:0		Sphingosina C14:0
	C22_SM		C25_HexCer_OH		Sphinganine C16:0		Sphingosina-1-P C18:0
	C23:1_SM		C26:1_HexCer_OH		Sphinganine-1-P C18:0		Sphingosina-1-P C16:0
	C23_SM		C26_HexCer_OH		C20 Sphinganine		C22:1 Sph
	C24:1_SM	GalCer	C16_Glc_Ceramide		C20 Sphinganine1P	Cer1P	C20:1 Sph
	C25:1_SM		C18_Glc_Ceramide				Cer1P (16:0)
	C25_SM		C24:1_Glc_Ceramide				Cer1P (24:0)
	C26:1_SM						
	C26_SM						

5.9. Processamento de Dados

A aquisição e processamento dos dados para identificação e quantificação dos lipídios foram realizados utilizando os softwares PeakView e MultiQuant (Sciex, Foster, CA, EUA). No PeakView foi possível identificar os analitos através do tempo de retenção, da razão massa/carga (m/z) do íon precursor, bem como o padrão de fragmentação da molécula através da razão m/z dos íons fragmentos.

Já a quantificação dos analitos foi realizada pelo MultiQuant. Nesse programa foi identificada a presença dos padrões internos nas amostras através de suas curvas. Para cada amostra, o programa marca a curva do padrão e a curva da amostra, e assim calcula a concentração dos analitos. No apêndice D estão as informações de tempo de retenção, razão m/z do íon precursor e íon fragmento de cada analito detectado nas amostras.

5.10. Estudo de Seguimento das Pacientes Oncológicas

O primeiro contato com as pacientes foi realizado na internação pré-cirúrgica conforme relatado no item 6.6 sobre coleta de dados. Posteriormente, novo contato foi feito via ligação telefônica para programar dia e horário para nova coleta de sangue. As coletas aconteceram no mesmo dia em que as pacientes tinham consultas de retorno com os médicos especialistas.

O tempo entre a primeira coleta (antes da cirurgia) e a segunda (após a cirurgia) variou de 8 a 16 meses. Apenas duas pacientes fizeram nova coleta com menos de 1 mês após a cirurgia. O estudo de seguimento finalizou em abril de 2021 quando os prontuários das pacientes foram consultados pela última vez para investigar informações relacionadas à recidiva, metástases ou óbito.

5.11. Análise Estatística

As análises estatísticas e gráficos foram realizados nos Programas GraphPad Prisma 9.0 e Metaboanalyst 5.0.

Os resultados foram avaliados quanto a distribuição normal dos dados através do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Os testes com $p > 0,05$ consideram que os dados obedecem à distribuição normal. Assim, para os dados normais foram realizados testes paramétricos e para os dados que não obedeceram à normalidade foram usados testes não paramétricos. Essas análises ocorreram no GraphPad Prisma.

Para as comparações entre dois grupos não pareados foram usados o teste de Mann Whitney (não paramétrico) ou o teste T não pareado (paramétrico). Já para as comparações entre dois grupos pareados foram utilizados o teste T pareado ou teste de Wilcoxon não paramétrico. Para as comparações entre três ou mais grupos não pareados foram realizadas análises de variância ANOVA one way (paramétrico) seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. Ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. Para as correlações, os dados foram analisados pela correlação de spearman, visto que os dados não obedeceram à distribuição normal. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando valor de $p < 0,05$.

Para as análises no programa Metaboanalyst, os dados foram organizados em tabelas no Excel e salvas no formato txt. No módulo de análise estatística foi realizada a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), o VIP score e os mapas de calor (heatmap) por agrupamento hierárquico. E no módulo de análise de biomarcadores foram realizadas as curvas ROC (Característica de Operação do Receptor) univariadas através das quais foram analisadas as áreas sobre a curva (AUC) para identificar o potencial dos possíveis biomarcadores selecionados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Perfil epidemiológico dos pacientes

Entre os meses de agosto de 2019 e dezembro de 2020 foram abordados 40 pacientes diagnosticados com neoplasia de mama na Fundação CECON. Entretanto, a fim de deixar a população do estudo mais homogênea, foram excluídos os pacientes que fizeram quimioterapia neoadjuvante e os pacientes do sexo masculino. Assim foram incluídas na pesquisa 25 mulheres diagnosticadas com câncer de mama e virgens de tratamento e 8 mulheres controles saudáveis que realizaram procedimento de cirurgia plástica para redução da mama. As pacientes foram distribuídas nos grupos caso e controle e descritas segundo as variáveis de interesse na tabela 6.

Quanto ao perfil sociodemográfico das pacientes com câncer de mama, a maioria tinha idade igual ou superior a 50 anos no diagnóstico (72%) com mediana de 58 anos, corroborando com a literatura que demonstra que a maioria dos cânceres de mama se desenvolvem a partir dos 50 anos (TAO et al., 2015). Além disso, a maioria das mulheres era de cor parda (88%), de média escolaridade (80%), e residentes na capital Manaus (84%). Esses resultados são próximos àqueles reportados por Rocha et al. em estudo semelhante na Região Norte do Brasil (ROCHA et al., 2018).

Neste grupo, metade da população (50%) teve menarca entre 13-14 anos e 37,5% tiveram menarca precoce com idade ≤ 12 anos. Quanto ao status menopausal, a maioria (72%) já atingiu a menopausa, sobretudo, após os 46 anos e 33,4% atingiram esse estado com idade ≥ 52 anos. Apenas uma mulher não conseguimos obter informações sobre menarca e menopausa por ser uma paciente especial. Segundo o estudo de Jung et al., há um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de mama em pacientes com menarca precoce ≤ 12 anos (HR – 1,57) e menopausa tardia ≥ 52 anos (HR – 1,59) (JUNG et al., 2016).

Quanto à paridade, a maioria (88%) teve filhos e somente 12% são nulíparas. Segundo Rojas e Stuckey, as mulheres nulíparas têm um risco maior de desenvolver câncer de mama. Ainda, segundo os autores, cada gestação diminuiu em 3% o risco de câncer de mama pré-menopausa, porém esse fator não tem um efeito protetor

tão forte nos cânceres pós-menopausa (ROJAS; STUCKEY, 2016). E quanto ao uso de hormônios exógenos, 48% relataram histórico de uso de contraceptivos. Mørch et al. relata um risco aumentado (HR – 1,20) para câncer de mama em mulheres que utilizaram qualquer contraceptivo comparado com aquelas que nunca fizeram uso (MØRCH et al., 2017)

Quanto ao histórico familiar, somente 16% relataram histórico de câncer de mama e 44% relataram para outros cânceres. Rojas e Stuckey relatam que o risco de desenvolver câncer de mama é três vezes maior para quem tem histórico da doença em parentes de primeiro grau (ROJAS; STUCKEY, 2016). Já em relação aos fatores ambientais, somente 32% relataram histórico de consumo de álcool e 44% histórico de tabagismo. A maioria apresentou sobrepeso (40%) e obesidade (32%). Esses resultados são semelhantes àqueles relatados por (ROCHA et al., 2018).

Já as pacientes controles, a maioria era jovem com idade inferior ou igual a 40 anos (87,5%), de alta escolaridade (87,5%) e todas residentes na capital. Metade das pacientes era de cor parda e casadas/união estável. Quanto às características reprodutivas, 50% tiveram menarca entre 13-14 anos e a maioria (87,5%) estão na pré-menopausa. Somente uma paciente deste grupo atingiu a menopausa. Semelhante às pacientes com neoplasia, a maioria também teve filhos (75%), não relatou histórico familiar de câncer de mama e apresentou sobrepeso. Entretanto, 50% relataram histórico para outros cânceres e todas as pacientes relataram uso de contraceptivos. Neste grupo, a maioria (87,5%) não relatou histórico de tabagismo, mas todas relataram histórico de uso de álcool.

Em relação às variáveis clínicas (tabela 7) das pacientes com câncer de mama, 66,7% (16) apresentaram tumores T2 de 2 a 5 cm, 84% (21) apresentaram como tipo histológico o carcinoma ductal invasivo e 65,2% (15) tiveram comprometimento de linfonodos regionais. Quanto ao perfil molecular pela imuno-histoquímica, 10 pacientes eram luminal A, 10 eram luminal B e 5 apresentaram superexpressão do receptor HER-2, sendo classificados como HER-2 positivo. Neste estudo foram excluídas as pacientes triplo-negativo, pois todas realizaram quimioterapia neoadjuvante. Quanto aos tipos de tratamentos, todas as pacientes foram submetidas aos procedimentos cirúrgicos, sobretudo à cirurgia radical com retirada completa da mama e linfonodos axilares, 36% (9) realizaram quimioterapia adjuvante e 48% (12) fez radioterapia. Até o final do seguimento, 12% (3) apresentaram metástase distante e 8% (2) recidiva na mesma mama.

Tabela 6: Variáveis sociodemográficas e de risco para o câncer de mama

Variáveis	Caso N (%)	Controle N (%)	Valor de p
No. de pacientes	25	8	
Idade do diagnóstico (mediana ± desvio)	58 ± 14,51	34,5 ± 6,67	<0,0001
≤ 40	3 (12,0)	7 (87,5)	
41-49	4 (16,0)	1 (12,5)	
50-59	7 (28,0)	—	
≥ 60	11 (44,0)	—	
Cor autodeclarada			0,0418
parda	22 (88,0)	4 (50,0)	
branca	3 (12,0)	3 (37,5)	
outras	—	1 (12,5)	
Escolaridade			0,0002
baixa	2 (8,0)	—	
média	20 (80,0)	1 (12,5)	
alta	3 (12,0)	7 (87,5)	
Estado civil			0,4494
solteiro	11 (44,0)	4 (50,0)	
casado ou união estável	8 (32,0)	4 (50,0)	
divorciado	3 (12,0)	—	
viúvo	3 (12,0)	—	
Município de residência			0,5503
capital	21 (84,0)	8 (100,0)	
interior	4 (16,0)	—	
Status menopausal			0,0024
pré-menopausa	6 (24,0)	7 (87,5)	
pós-menopausa	18 (72,0)	1 (12,5)	
indefinido	1 (4,0)	—	
Idade da menarca (anos)	13 ± 1,38	13,5 ± 1,40	0,5475
≤12	9 (37,5)	3 (37,5)	
13-14	12 (50,0)	4 (50,0)	
>14	3 (12,5)	1 (12,5)	
Idade da menopausa (anos)	49,5 ± 7,42	30	—
≤45	4 (22,2)	1 (12,5)	
46–51	8 (44,4)	—	
≥52	6 (33,4)	—	
Paridade			0,5497
nulípara	3 (12,0)	2 (25,0)	
multípara	22 (88,0)	6 (75,0)	
Histórico de terapia hormonal			0,0116
sim	12 (48,0)	8 (100,0)	
não	13 (52,0)	—	
Histórico familiar de câncer de mama			>0,9999
sim	4 (16,0)	2 (25,0)	
não	21 (84,0)	6 (75,0)	
Histórico familiar de outros cânceres			>0,9999
sim	11 (44,0)	4 (50,0)	
não	14 (56,0)	4 (50,0)	
Histórico de tabagismo			0,3939
sim	8 (32,0)	1 (12,5)	
não	17 (68,0)	7 (87,5)	
Histórico de consumo de álcool			0,0104
sim	11 (44,0)	8 (100,0)	
não	14 (56,0)	—	
IMC (kg/m²)			0,17
<25	6 (24,0)	3 (37,5)	
25 - 29	10 (40,0)	5 (62,5)	
≥ 30	8 (32,0)	—	

Tabela 7: Variáveis clínicas das pacientes oncológicas

Variáveis	N	%
Tamanho do tumor	24	
T1 - < 2cm	4	16,7
T2 - 2 a 5 cm	16	66,7
T3 - > 5 cm	4	16,7
Tipo histológico	25	
ductal invasivo	21	84
lobular invasivo	3	12
outros	1	4
Imunohistoquímica	25	
Luminal A	10	40
Luminal B	10	40
HER-2 superexpresso	5	20
Comprometimento de linfonodos regionais	23	
sim	15	65,2
não	8	34,8
Tipo de cirurgia	25	
radical	20	80
conservadora	5	20
Quimioterapia adjuvante	25	
sim	9	36
não	13	52
sem informação	3	12
Radioterapia	25	
sim	12	48
não	6	24
sem informação	7	28
Metástase distante	25	
sim	3	12
não	22	88
Recidiva	25	
sim	2	8

6.2. Produção de mediadores inflamatórios solúveis

6.2.1. Expressão diferenciada de citocinas e quimiocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17 nas amostras de tumores e no soro de pacientes.

Com o objetivo de identificar o perfil da resposta imune no câncer de mama foram quantificadas as produções de citocinas e quimiocinas nos tecidos tumorais, nos soros das pacientes antes e após cirurgia de mastectomia e nos tecidos de mama e soro dos controles saudáveis. Na figura 5A observamos que a produção da maioria dos mediadores inflamatórios analisados estava aumentada no tecido controle em comparação com o tecido tumoral, com exceção de IL-17 ($p = 0,0072$), CXCL10 e GM-CSF, embora estes últimos não tenham apresentado diferença significativa entre os grupos de pacientes.

Esses resultados foram inesperados, pois a expectativa era que no tecido tumoral houvesse maior produção desses mediadores inflamatórios em relação ao tecido sadio. Entretanto, quando se analisa o perfil das pacientes que constituíram o grupo controle, observa-se que a maioria são jovens com idade entre 24 e 45 anos em estado pre-menopausal. Logo, possuem mamas mais densas, ou seja, maior tecido glandular que tecido adiposo, conforme afirmaram Checka et al. e Ji et al. que mamas densas estão associadas às mulheres jovens pré-menopausadas (CHECKA et al., 2012; JI et al., 2021).

Além disso, alguns trabalhos relacionam a produção de citocinas e quimiocinas com a densidade do tecido mamário. Huo et al., por exemplo, relataram que nas áreas mais densas do tecido mamário, ou seja, nas áreas que apresentam mais epitélio, estroma, colágeno e menor quantidade de gordura, há o aumento de células imunes CD45⁺. Neste estudo, os autores demonstraram ainda um número aumentado de macrófagos CD68⁺, células dendríticas CD11c⁺, células B CD20cy⁺ e células T CD4⁺ nas regiões mais densas que nas regiões menos densas (HUO et al., 2018). Nesse contexto, Sun et al. demonstraram a expressão aumentada de CCL2 no epitélio das regiões mais densas da mama. Portanto, infere-se que o aumento dos mediadores inflamatórios nos controles seja devido à maior densidade desses tecidos que possuem maior número de células imunes e com isso maior quantidade desses mediadores (SUN et al., 2017).

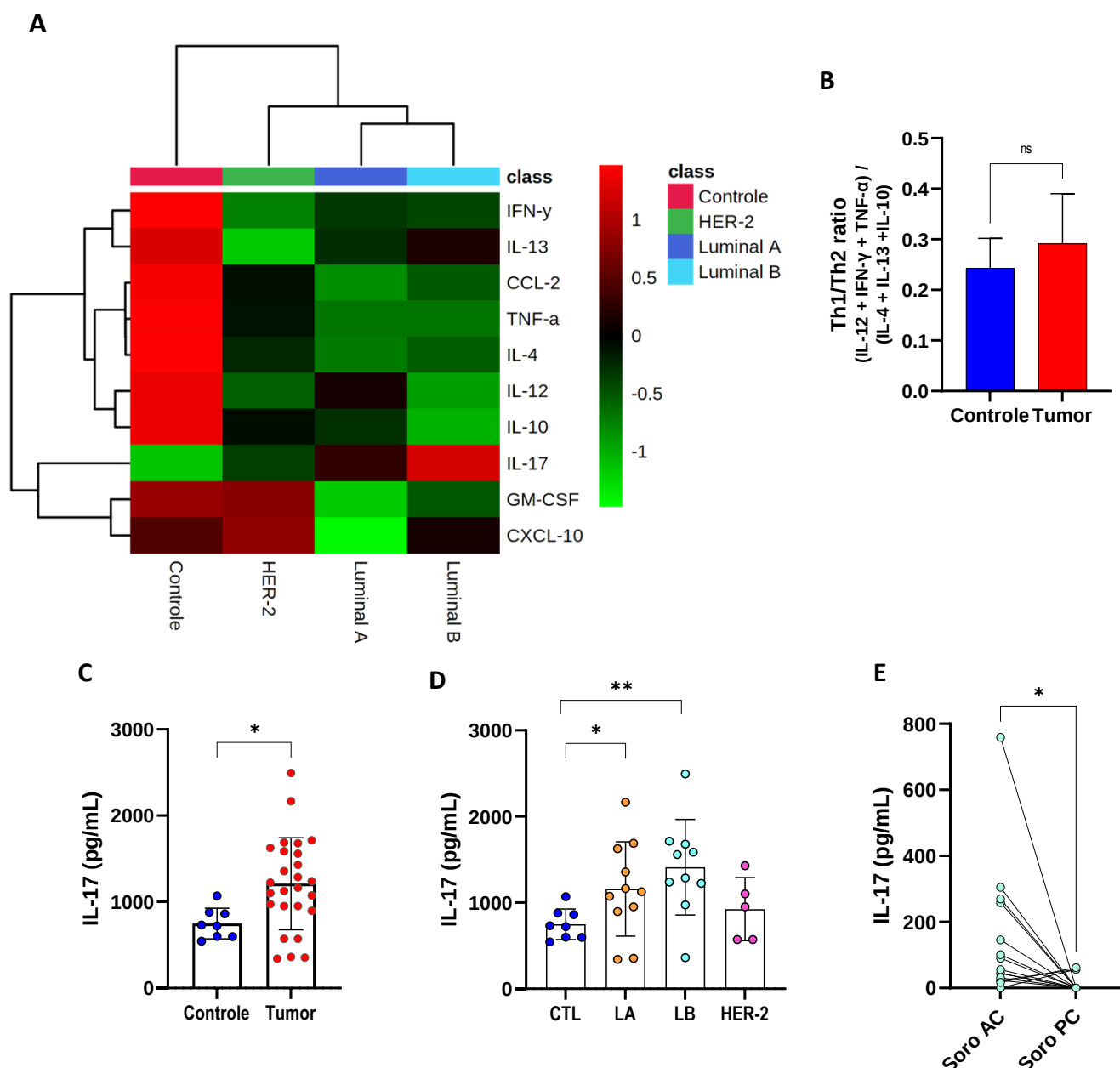


Figura 5. Produção aumentada de IL-17 em tumores mamários e a razão da resposta imune Th1/Th2 nestes tecidos. (A) Mapa de calor de citocinas e quimiocinas produzidas no microambiente tumoral em comparação com tecido mamário de controles saudáveis. **(B)** Balanço das respostas Th1 e Th2 nos tecidos controles e tumoral. **(C)** Produção de IL-17 nos tumores mamários e **(D)** de acordo com os subtipos moleculares: Luminal A (LA), Luminal B (LB) e HER-2 positivo comparados com os controles saudáveis (CTL). **(E)** Produção de IL-17 no soro pré-cirúrgico (AC) e no soro pós-cirúrgico (PC). *diferença estatística entre os grupos com $p < 0,05$. (ns) não significativo.

Analisando a polarização da resposta imune no câncer de mama utilizamos a estratégia de somar as concentrações das citocinas do padrão Th1 (IFN- γ , TNF- α e IL-12) e as do padrão Th2 (IL-4, IL-13 e IL-10) e calcular a razão entre elas. Na

figura 5B, observamos que a razão apresentou um valor menor que 1,0; sugerindo que a resposta imune Th1/Th2 nos tumores e nos controles está mais polarizada para o perfil Th2, no entanto nenhuma diferença significativa foi observada para o grupo tumoral em relação ao controle. Huo et al. relataram que a resposta padrão Th2 em tumores está relacionada com um microambiente pró-tumoral, onde as células cancerosas tendem a escapar das células do sistema imune por processo de imunotolerância. Além disso, os autores também reportam que os tecidos mamários de maior densidade estão associados à polarização Th2, corroborando com o que foi encontrado no grupo controle (HUO et al., 2018).

Um outro dado interessante é que a IL-17 foi a única citocina que esteve aumentada no tumor em comparação ao controle (figura 5C). Estes dados foram semelhantes a outros estudos com amostras de tumor de pacientes, como o de Cochaud et al. que detectaram moderada e alta infiltração de células imunes IL-17A⁺, principalmente macrófagos e linfócitos, em 20% dos casos estudados de câncer de mama, enquanto poucas células deste fenótipo foram detectadas nos tecidos normais. Su et al. também relataram uma frequência muito maior de células produtoras de IL-17 (3,8%) nos tecidos tumorais que nos tecidos normais (<1%), sobretudo de linfócitos Th17 (COCHAUD et al., 2013; SU et al., 2010).

Chen et al. e Cochaud et al. demonstraram altos níveis de células produtoras de IL-17 correlacionados positivamente com o status negativo dos receptores de estrógeno e progesterona no câncer de mama (CHEN et al., 2013; COCHAUD et al., 2013). Porém, neste trabalho não observamos essa correlação. Na figura 5D observamos que as quantidades de IL-17 estão aumentadas, sobretudo, nos subtipos luminais A e B quando comparados ao controle. Na coorte deste estudo, a maioria das pacientes oncológicas apresentaram positividade tanto para RE quanto para RP em todos os subtipos, inclusive no HER-2 superexpresso.

Quando analisamos a produção sérica de IL-17 antes e após a retirada do tumor, verificamos uma diminuição significativa nas quantidades desta citocina após a cirurgia (figura 5E). Kawaguchi et al. relataram aumento de IL-17 no soro de pacientes com câncer de mama e sugeriram que a produção sistêmica desta citocina estava correlacionada com uma completa resposta patológica. Os autores ainda reportaram a diminuição da produção de IL-17 em 36,6% de todos os casos de câncer de mama após a administração da quimioterapia neoadjuvante

(KAWAGUCHI et al., 2019). Dessa forma, podemos sugerir que a retirada do tumor influenciou a produção sérica de IL-17 nas pacientes do nosso estudo.

Dados os resultados observados neste estudo e a importância da IL-17 no contexto do câncer de mama em que vários trabalhos relatam que a citocina provoca mudanças no microambiente tumoral, contribui com a angiogênese e metástase e está relacionada com maior agressividade e progressão tumoral, além de ser um baixo fator prognóstico na sobrevida dos pacientes com câncer de mama (BURKHOLDER et al., 2014; WELTE; ZHANG, 2015), verificaremos a influência desta citocina no metabolismo de lipídios tumorais e as perspectivas do seu uso como biomarcador de subtipo tumoral no câncer de mama.

6.2.2. Formação de eicosanoides nos tecidos tumorais de mama e sua correlação com a produção IL-17.

Entre as espécies lipídicas analisados neste estudo estão os eicosanoides (EICs), uma classe de mediadores lipídicos que está envolvida no processo inflamatório e na progressão tumoral (JOHNSON; KLECZKO; NEMENOFF, 2020). Para a análise desses mediadores foram utilizadas amostras de tecidos mamários sadios dos indivíduos controle (CT), e das pacientes com câncer de mama obtivemos tecidos do tumor (TU) e tecido distante do leito tumoral, o qual denominamos de tecido normal (NM). Na figura 6 estão representados os eicosanoides que foram detectados em todas estas amostras de tecidos mamários.

Observamos que todos os mediadores lipídicos detectados pelo método de LC-MS/MS, exceto 11-HETE, foram mais expressos nos tecidos tumorais que nos controles ou tecidos normais. Na via das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), a prostaglandina (PG) E₂ e o tromboxano (TX) B₂ foram os únicos prostanoides detectados. No entanto, na via das lipoxigenases (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) foram detectados os ácidos hidroxeicosatetraenoicos (HETE), como 5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE e 15-HETE, e seus produtos de oxidação, os ácidos oxoeicosatetraenoicos (oxo-ETEs) do tipo 12-oxo-ETE e 15-oxo-ETE. Porém, não observamos a produção de leucotrienos (LTs) ou lipoxinas (LX) que também são produzidos nestas vias metabólicas.

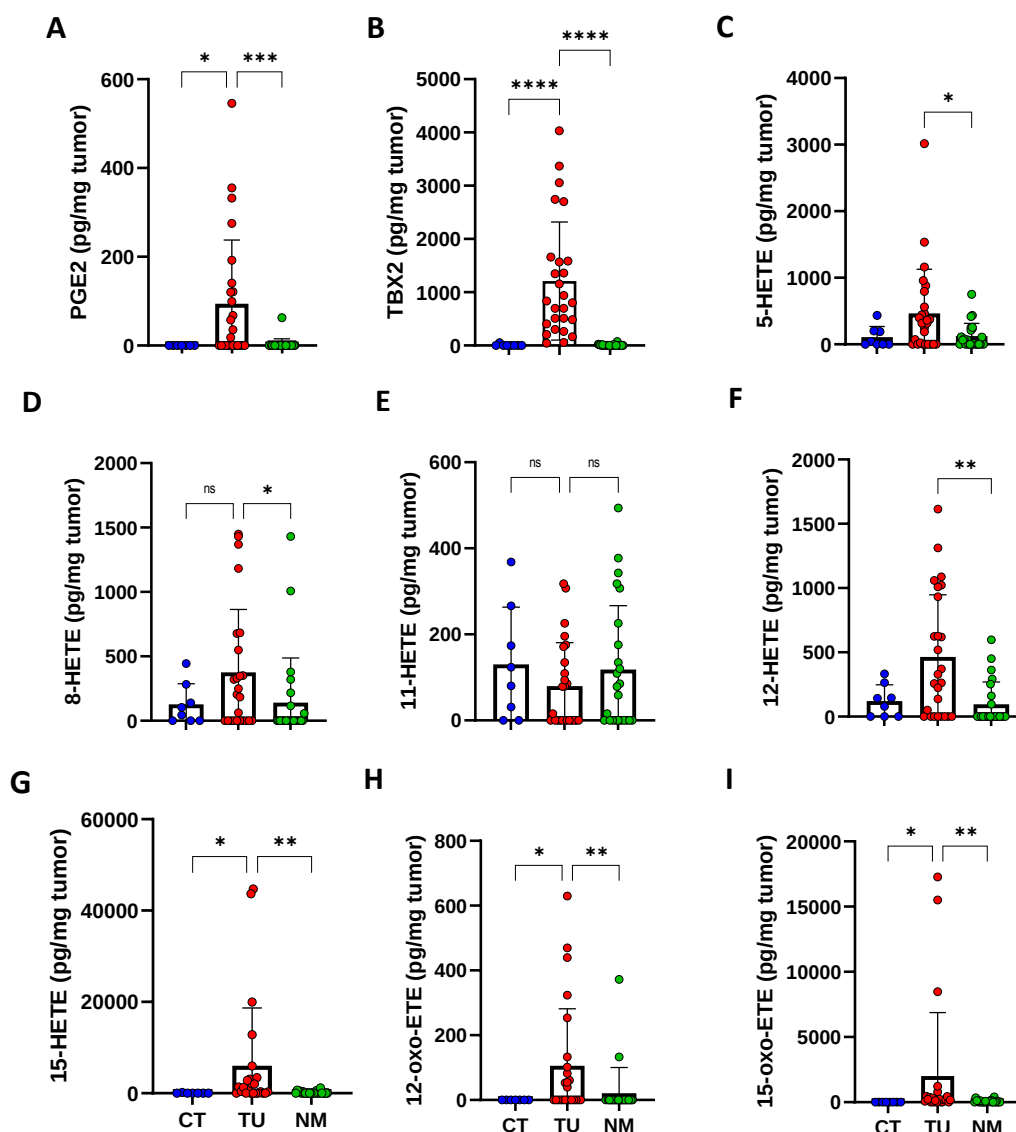


Figura 6. Produção diferenciada de eicosanoides nos tecidos tumorais comparadas com os tecidos normais e controles. Os EICs foram extraídos do homogenato de tecidos sólidos por extração em fase sólida (SPE) e posteriormente, foram identificados e quantificados por LC-MS/MS. Os analitos observados em quantidades > LQ (limite de quantificação) foram: **(A)** PGE2, **(B)** TXB2, **(C)** 5-HETE, **(D)** 8-HETE, **(E)** 11-HETE, **(F)** 12-HETE, **(G)** 15-HETE, **(H)** 12-oxo-ETE e **(I)** 15-oxo-ETE. Diferenças estatísticas foram aplicadas para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e (ns) não significativo entre os grupos analisados.

Um fato interessante é que não houve diferenças estatísticas na produção de EICs entre o tecido normal (NM) das pacientes com câncer de mama e os tecidos de indivíduos saudáveis (CT), inferindo que um tecido retirado da mesma mama que possui o câncer, porém distante do tumor, possui características de composição

lipídicas semelhante ao controle. Esses dados reforçam a nossa ideia sobre a especificidade do metabolismo lipídico nos tecidos tumorais e sua importância como alvos terapêuticos.

O aumento da produção de PGE_2 nos tumores (figura 6A) corrobora com outros trabalhos que demonstraram a abundância de PGE_2 em diversas neoplasias, entre elas o câncer de mama, devido ao aumento da expressão de COX-2 no tecido tumoral (BASU; ROSSARY; VASSON, 2016; KOCHER; GOLOUBEVA; FULTON, 2016; WANG; DUBOIS; RICHMOND, 2010). No trabalho de O'Flaherty et al. os autores também relataram maior produção de PGE_2 no tecido tumoral de mama que no tecido normal (O'FLAHERTY et al., 2013).

Neste sentido, Hirata e Narumiya mostraram que a produção de PGE_2 induzida por células tumorais afeta as funções de células NK e tem efeitos na atividade de células dendríticas. A presença de PGE_2 durante a maturação das células dendríticas inibe a produção de quimiocinas como CXCL10 e citocinas como a IL-12. Como consequência, as células dendríticas falham em atrair as células NK, diminuindo a produção de IFN- γ mediada por NK e reduzindo a polarização Th1 (HIRATA; NARUMIYA, 2012). Esse mecanismo pode estar envolvido na diminuição da resposta Th1 vista também neste trabalho.

Seguindo a hipótese de que a COX-2 está com expressão aumentada nos tumores de mama, infere-se que a enzima esteja envolvida no aumento na produção de tromboxano A_2 (TXA_2) no microambiente tumoral, que é um metabólito instável no meio aquoso e espontaneamente hidrolisa no hemiacetal biologicamente inativo TXB_2 (EKAMBARAM et al., 2011) que foi observado na figura 6B.

Watkins et al. analisaram a expressão da sintase de tromboxano (TXA_2S) e do receptor TBXA_2R no câncer de mama e relataram maior expressão do receptor TBXA_2R no tumor, mas não observaram diferenças na expressão da enzima (TXA_2S) entre os grupos. Já Li et al. relataram que a via do TXA_2 é ativada durante o desenvolvimento do câncer de mama. Ainda, os autores observaram aumento na expressão da enzima TXA_2S e do receptor TBXA_2R no tecido tumoral comparados com o tecido normal adjacente, e relacionaram o TXA_2 como um mediador da progressão tumoral (LI et al., 2017; WATKINS et al., 2005)

Em relação aos HETEs, observamos maior produção de 5-HETE, 8-HETE, 12-HETE e 15-HETE nos tumores (figuras 6C, 6D, 6F, 6G), semelhante ao encontrado por O'Flaherty et al. que demonstraram maior produção de 5-HETE, 12-

HETE e 15-HETE nos tecidos tumorais de mama quando comparados com tecidos normais adjacentes. Jiang et al. reportaram expressão aumentada de 5-lipoxigenase (5-LOX) e da proteína ativadora de 5-LOX (FLAP), como também de 12-LOXs em amostras de câncer de mama. As enzimas 5-LOX/FLAP são necessárias para a produção de 5-HETE, que está envolvido no aumento da proliferação celular e na ativação de vias de sinalização anti-apoptóticas (JIANG; DOUGLAS-JONES; MANSEL, 2006, 2003; O'FLAHERTY et al., 2013; STEINHILBER et al., 2010).

De forma semelhante, Natarajan et al. relataram maior expressão de mRNA12-LOX nos tumores de mama que nos tecidos normais dos mesmos pacientes, o que também corrobora com Honn et al. que cita que diversos tumores sólidos têm aumento da expressão do RNAm e da proteína 12-LOX, como também o metabólito 12-HETE (HONN et al., 1994; NATARAJAN et al., 1997). Possivelmente, esses dados podem explicar a maior produção de 12-HETE e consequentemente 12-oxo-ETE em nosso estudo (figura 6F e 6H).

Quando analisamos a produção de 15-HETE e 15-oxo-ETE (figura 8G e 8I), observamos que estes foram os mediadores mais produzidos no tumor em quantidades relativas aos outros EICs. Entretanto, a expressão das enzimas formadoras de 15-HETE, 15-LOX-1 E 15-LOX-2, varia de acordo com o tipo de câncer (POWELL; ROKACH, 2015). Ikawa et al. demonstraram níveis elevados 15-LOX-1 em células de câncer colorretal quando comparados com tecido normais, enquanto Jiang et al. observaram menor expressão de 15-LOX-1 e 15-LOX-2 nos tecidos de câncer de mama quando comparados com os tecidos normais adjacentes (IKAWA et al., 1999; JIANG et al., 2006).

Entretanto, Powell e Rokach relataram que os níveis de 15-LOX-1 podem aumentar em condições de hipóxia e consequentemente aumentar os níveis de 15-HETE. Além disso, os autores também reportam que 15-HETE pode ser produzido através do rearranjo de outros HETEs formados pela via do citocromo P450 que são instáveis em meio ácido. Assim, podemos sugerir que a produção aumentada de 15-HETE neste estudo pode ser pelas condições de hipóxia no microambiente tumoral que aumentam a expressão de 15-LOX-1 ou pela produção via citocromo P450 (POWELL; ROKACH, 2015). Consequentemente, as quantidades elevadas de 15-oxo-ETEs (figura 6I) podem ser originadas pela oxidação do 15-HETE

Levando em conta a heterogeneidade dos tumores de mama, analisamos ainda as diferenças nas produções de EICs nos subtipos Luminal A, B e HER-2.

Desta forma, observamos que na maioria dos mediadores lipídicos detectados, ocorreu aumento significativo na produção em tecidos tumorais em relação aos normais, mas não foi observada diferenças estatísticas entre os grupos (figura 7). Com exceção da produção de PGE_2 que foi maior em HER-2 em relação ao Luminal B (figura 7A); 8-HETE (figura 7D) e 12-HETE (figura 7F) que também foi maior no grupo HER-2 comparado com o grupo Luminal A.

Na comparação entre os subtipos de tumor com o tecido normal, observamos que os subtipos Luminal B e HER-2 apresentaram diferenças significativas na produção de quase todos EICs, com exceção de 12-oxo-ETE (figura 7H) e 15-oxo-ETE (figura 7I). Porém, o subtipo Luminal A não produziu quantidades significativas de EICs da classe HETEs, demonstrando expressão aumentada somente nos metabólitos derivados de COX-2, como PGE_2 e TXB_2 (figura 7A e 7B). Estes dados sugerem que o metabolismo de LOXs pode não estar tão ativo nos tumores do subtipo Luminal A, mas que o uso de inibidores de COXs pode ser um alvo farmacológico nestes tipos de tumores.

Da mesma forma, estes resultados sugerem que os subtipos Luminal B e HER-2 por apresentarem maior proliferação celular devido à maior expressão de Ki-67 e do receptor HER-2, respectivamente, podem induzir a formação de EICs relacionados a neovascularização e crescimento celular. Como também, sugerimos que o receptor HER-2 pode ter relação com a maior produção de PGE_2 , 8-HETE e 12-HETE nestes subtipos de tumores.

No intuito de verificar a formação de EICs no sangue periférico e sua correlação com a produção do tecido tumoral, fizemos análises utilizando o soro de pacientes antes e após o tratamento cirúrgico. Como demonstrado na figura 8, poucos EICs foram detectados no soro e em concentrações menores que no tecido tumoral. PGE_2 , TXB_2 , 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE e 15-oxo-ETE foram identificados e quantificados, mas não apresentaram diferenças significativas em relação aos períodos antes e pós-cirúrgico. Esse resultado foi semelhante ao de Kort et al. que identificaram TXB_2 , 5-HETE e 12-HETE no soro de pacientes com câncer de mama, porém não viram diferença significativa nos níveis séricos desses EICs antes e após a cirurgia (KORT et al., 1992). Esses dados sugerem que o metabolismo de EICs é um fenômeno bioquímico específico dos tecidos tumorais e pode não ter relevância no cenário sistêmico.

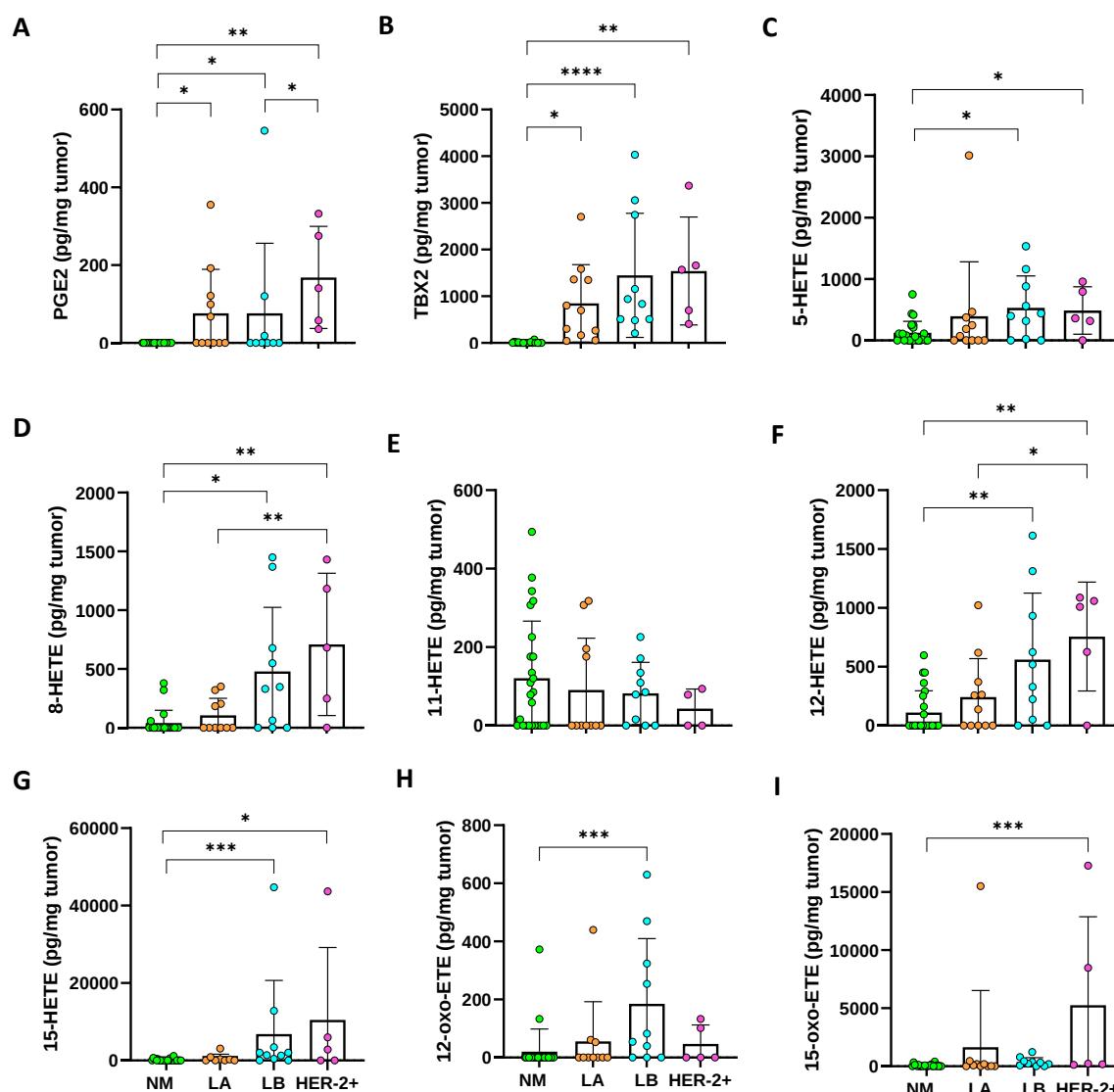


Figura 7. Produção de eicosanoides nos tecidos tumorais de subtipos de câncer de mama. EICs foram extraídos do homogenato dos tecidos sólidos dos subtipos Luminal A (LA), Luminal B (LB) e HER-2 positivo (HER-2+) e comparado com tecido normal (NM) correspondente de cada paciente. Os lipídios foram identificados e quantificados por LC-MS/MS e os analitos observados em quantidades > LQ (limite de quantificação) foram: **(A)** PGE2, **(B)** TXB2, **(C)** 5-HETE, **(D)** 8-HETE, **(E)** 11-HETE, **(F)** 12-HETE, **(G)** 15-HETE, **(H)** 12-oxo-EETE e **(I)** 15-oxo-EETE. Diferenças estatísticas foram aplicadas para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e (ns) não significativo entre os grupos analisados.

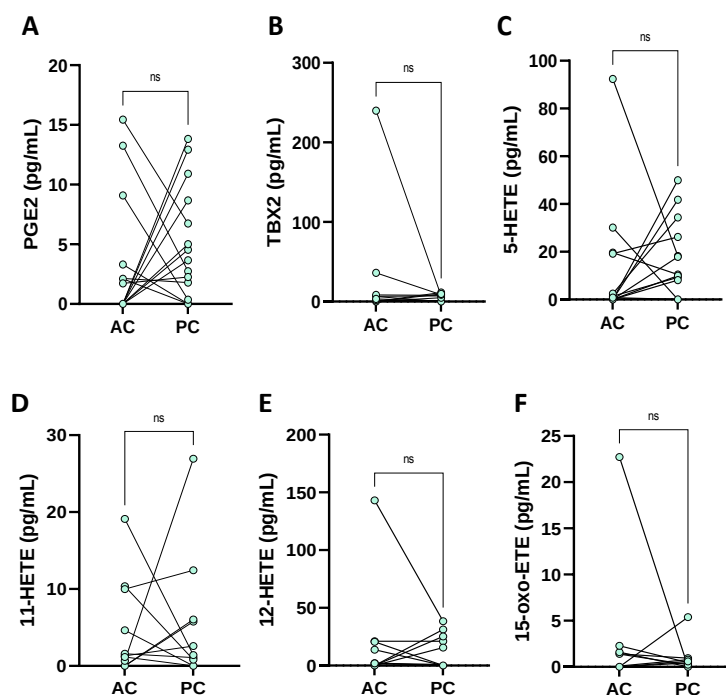


Figura 8. Produção de eicosanoides no soro pré-cirúrgico (AC) e pós-cirúrgico (PC) em pacientes com câncer de mama. EICs foram extraídos do soro de pacientes com câncer de mama independente do subtipo. Os lipídios foram identificados e quantificados por LC-MS/MS e os analitos observados em quantidades > LQ (limite de quantificação) foram: (A) PGE2, (B) TXB2, (C) 5-HETE, (D) 11-HETE, (E) 12-HETE e (F) 15-oxo-EETE. Diferenças estatísticas foram aplicadas para $p < 0,05$; e (ns) representa não significativo entre os grupos analisados.

Independente do mecanismo inflamatório evidenciado no microambiente tumoral, uma análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi realizada para verificar o comportamento dos EICs como descritores de grupos aplicados aos resultados de tecidos tumorais e normal. Na figura 9A, observamos que os clusters dos grupos não ficaram bem separados, porém identificamos no escore *VIP* (Importância da Variável na Projeção) os metabólitos que mais influenciaram o resultado da PLS-DA.

Segundo Cocchi et al., o valor mínimo de escore *VIP* aceitável é 1.0 e quanto maior o escore, maior a contribuição da variável para a análise discriminante (COCCHI; BIANCOLILLO; MARINI, 2018). Neste trabalho foram selecionados os metabólitos que apresentaram escore *VIP* acima de 1,5 (figura 9B). Desta forma, entre os EICs analisados, foram selecionados o 11-HETE e o TXB2 como os metabólitos com potencial de distinguir entre os grupos analisados, sugerindo que possam ser utilizados como biomarcadores para o câncer de mama.

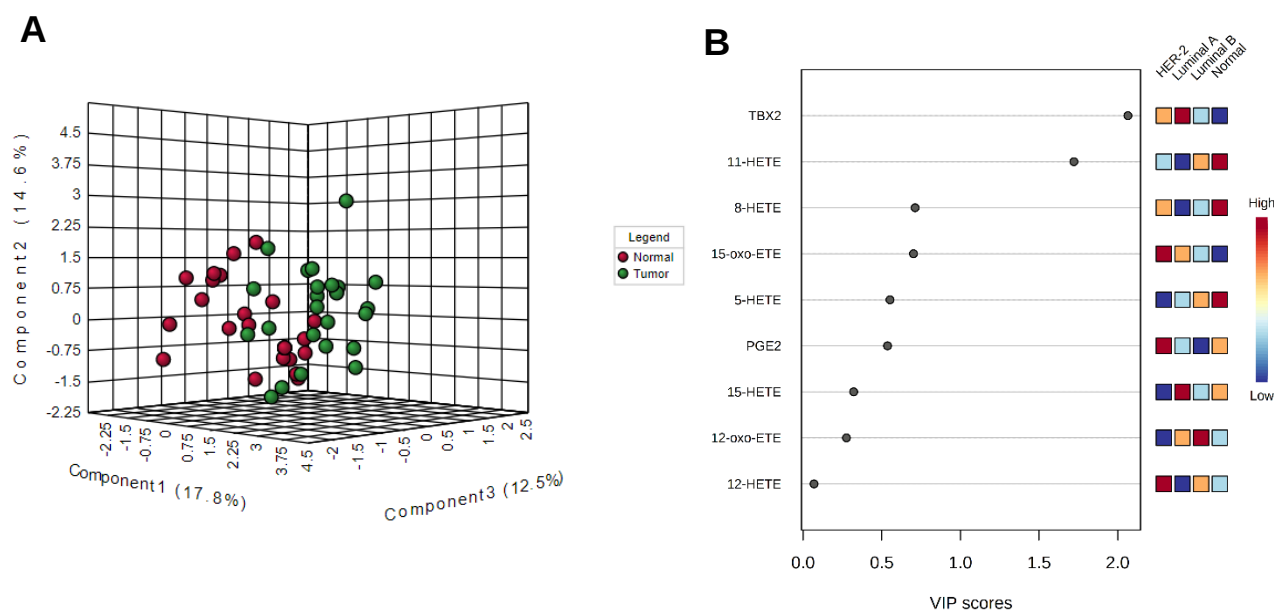


Figura 9: Análise discriminante da produção de eicosanoides entre tumor e tecido normal. (A) Análise de componente principal (PCA) de todas as variáveis detectadas na via dos EICs. **(B)** Análise de escore VIP, selecionando as espécies de EICs com índice > 1,5, representado as diferenças dos subgrupos de tumor em forma de mapa de calor.

Para verificar se existem correlações entre IL-17 e os EICs detectados nos tecidos analisados utilizamos ferramentas estatísticas como correlação de Spearman, visto que as variáveis não passaram pelo teste de normalidade. Na figura 10 estão representadas as matrizes de correlação para cada subtipo de tumor, sendo Luminal A (figura 10A), Luminal B (figura 10B) e HER-2 positivo (figura 10C). Além disso, na tabela (figura 10D) estão especificados os valores de r_s e p das análises individuais.

Segundo Akoglu, o coeficiente rho de Spearman (r_s) pode ser classificado em: $r_s = 0,10$ a $0,30$ (fraco); $r_s = 0,40$ a $0,60$ (moderado); e $r_s = 0,70$ a $0,90$ (forte) (AKOGLU, 2018). Seguindo esse guia de correlação, observa-se no subtipo Luminal A que a maioria das correlações entre IL-17 e os EICs foram fracas e negativas. A citocina teve uma correlação moderada negativa com PGE2 e duas positivas fracas com 11-HETE e 12-oxo-EETE, porém nenhuma foi estatisticamente significativa. Nos subtipos Luminal B e HER-2, a maioria das correlações com IL-17 foram positivas e variaram entre fracas e fortes, mas nenhuma teve significância estatística.

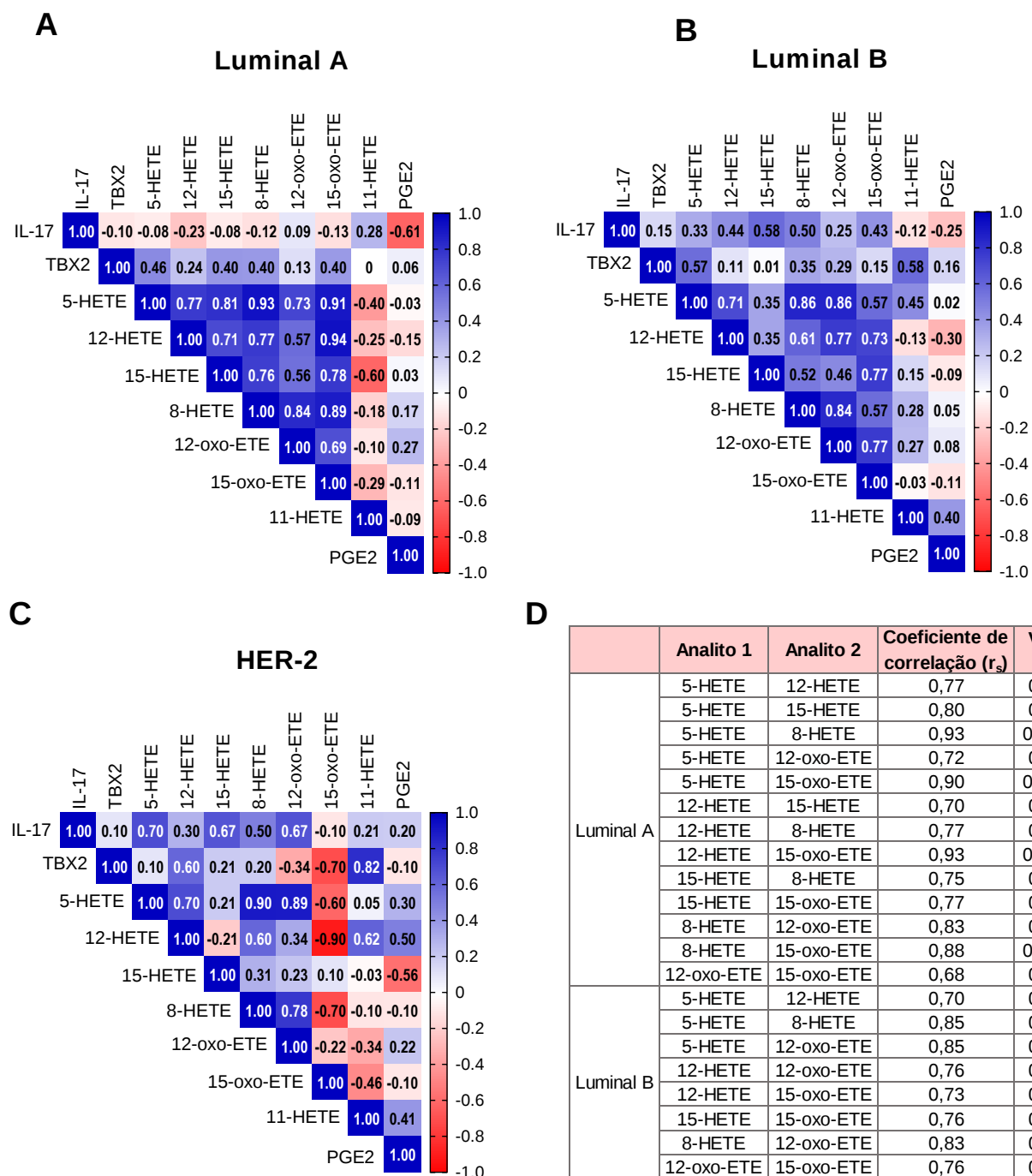


Figura 10. Análises das correlações de Spearman entre IL-17 e os eicosanoides detectados nos subtipos de tumores de mama. Matrizes de correlação para os subtipos **(A)** Luminal A, **(B)** Luminal B e **(C)** HER-2. Os dados individuais dos coeficientes de correlação rho de Spearman (r) e valor de p estão expressos em **(D)** tabela em anexada, considerando diferenças estatísticas significativas para $p < 0,05$.

Porém, observamos relações entre os EICs produzidos em cada subtipo de câncer. Nos subtipos Luminal A e Luminal B observamos correlações positivas,

fortes e significativas entre os analitos 5-HETE/8-HETE, 5-HETE/12-HETE, 5-HETE/12-oxo-ETE, 15-HETE/15-oxo-ETE, 8-HETE/12-oxo-ETE e 15-oxo-ETE/12-oxo-ETE. Demonstrando coerência entre os perfis metabólicos de EICs nos subtipos de câncer de mama.

Entre os EICs detectados nas amostras, PGE₂, TXA₂, 5-HETE e 12-HETE já foram demonstrados como envolvidos na progressão tumoral (GOMES; SOUZA; COLQUHOUN, 2018; KOCHER; GOLOUBEVA; FULTON, 2016; LI; TAI, 2013; POWELL; ROKACH, 2015). A função de 8-HETE na tumorigênese ainda é incerta, mas há evidências de que tem papel antitumoral (GREENE et al., 2011). Entretanto, a função de 15-HETE nos tumores é ambígua e os estudos indicam que este mediador lipídico pode estar envolvido na regulação do desenvolvimento tumoral. O papel de 12-oxo-ETE e 15-oxo-ETE é menos explorado na literatura da área, mas este último parece inibir a proliferação de células endoteliais, sugerindo que tenha efeito antiangiogênico (POWELL; ROKACH, 2015).

Dessa forma, observamos que no microambiente tumoral são produzidos diversos EICs com funções antagônicas pró- e antitumoral. Importante ressaltar que o metabolismo destes lipídios é específico do tecido tumoral, não apresentando relevância sistêmica devido a baixa produção sérica. Além disso, os EICs são considerados mediadores inflamatórios, mas não correlacionamos o metabolismo destes lipídios com a produção de IL-17 nos tecidos tumorais, demonstrando vias de inflamação e regulação independentes no microambiente tumoral.

6.3. Modulação do metabolismo de esfingolipídios no câncer de mama

Outros estudos já abordaram a relevância do metabolismo de esfingolipídios no desenvolvimento do câncer de mama (NAGAHASHI et al., 2016). No entanto, a influência do estado inflamatório no microambiente tumoral na modulação da produção destes esfingolipídios ainda não foi evidenciada. Nas amostras de tumor mamário e de tecido normal do nosso estudo foram identificadas 53 espécies de lipídios derivados dos esfingolipídios, principalmente as classes ceramidas (Cer), esfingosinas, esfinganinas, esfingomielinas (SM), galactosilceramidas (GalCer), lactosilceramidas (LacCer), Hexoglicosilceramidas (HexCer) e diidroceramidas (DhCer) (figura 11).

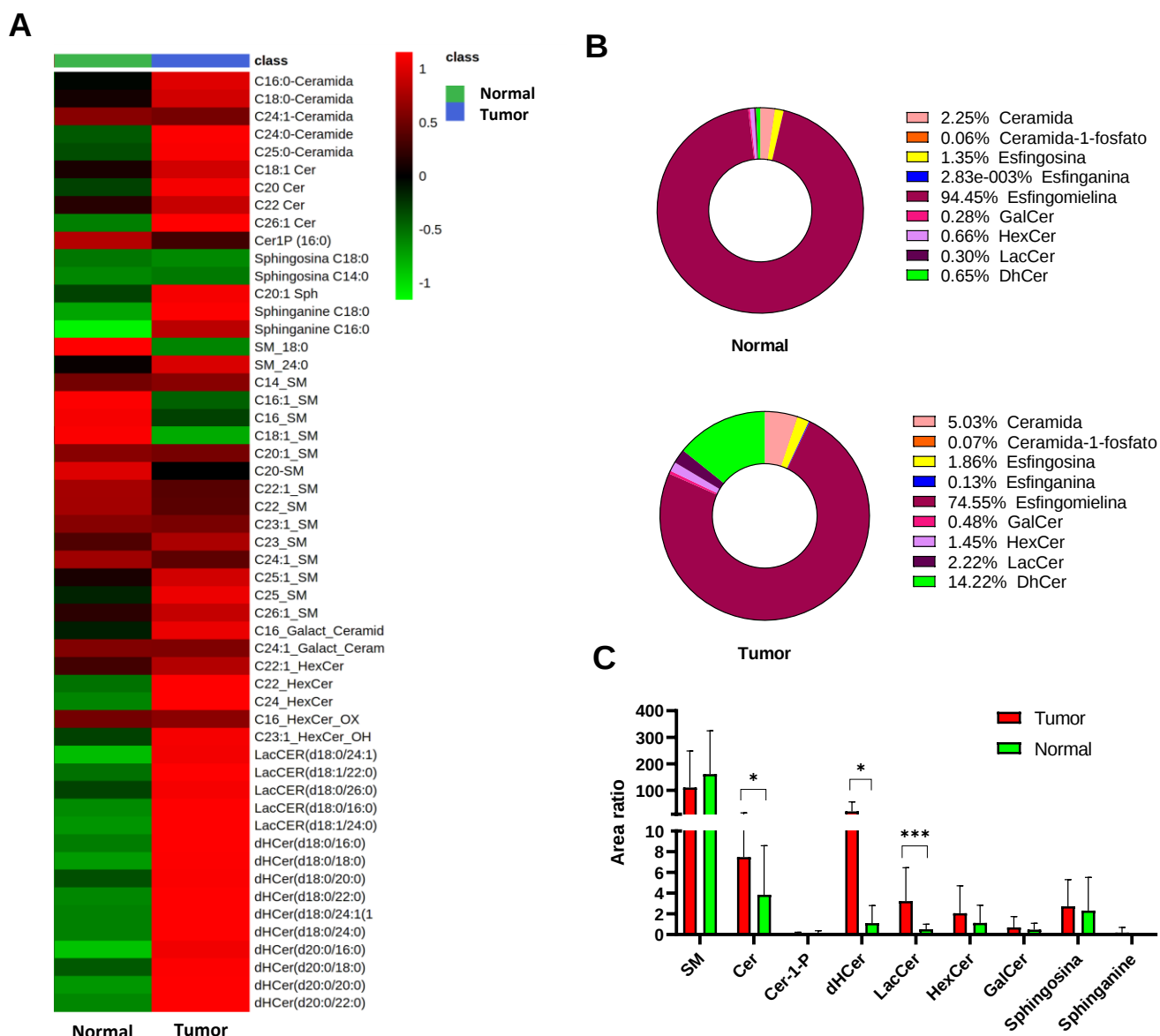


Figura 11: Determinação dos metabólitos da via dos esfingolípídios no tecido tumoral e normal. (A) Mapa de calor das espécies de esfingolípídios detectadas nas amostras por LC-MS/MS. (B) Frequência relativa de esfingolípídios no tecido tumoral e normal. (C) Expressão de classes de esfingolípídios representada pela razão entre a área dos analitos e área do padrão interno (area ratio). Diferença estatística entre os grupos para $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. SM, esfingomielina; Cer, ceramida; Cer-1-P, ceramida-1-fosfato; dHCer, diidroceramida, LacCer, lactosilceramida; HexCer, Hexoglicosilceramida; GalCer, galactosilceramida.

Desta forma, demonstramos através de mapas de calor as espécies individuais de esfingolípídios detectados e suas diferenças na produção entre os tecidos tumorais e o tecido normal correspondente da mesma paciente. Observamos

que na maioria dos metabólitos analisados ocorreu um aumento considerável da produção das espécies de esfingolipídios nos tumores, mostrando que este metabolismo está muito afetado na biologia tumoral. As únicas exceções foram a produção de C18:0-SM, C18:1-SM, C16:0-SM e C16:1-SM que diminuíram no tecido tumoral em relação ao normal (figura 11A).

Analisando as frequências de distribuição das classes de esfingolipídios, demonstramos que o tecido normal é predominantemente constituído de SMs (94,45%). Entretanto, no tecido tumoral, além das SMs (74,55%), outras classes tiveram sua frequência aumentada significativamente em relação ao tecido normal, como as Cer (5,03%) dHCer (14,22%), e LacCer (2,22%); enquanto as demais classes analisadas mantiveram suas proporções próximas ao observados no tecido normal (figura 11B e 11C).

Nagahashi et al. reportaram aumento de espécies de Cer, SM, HexCer, esfingosina-1-fosfato (S1P) e diidroesfingosina (DhSph) e Moro et al. reportaram aumento de dHCer em amostras de tecidos de câncer de mama em relação ao tecido normal adjacente (MORO et al., 2018; NAGAHASHI et al., 2016). Semelhante ao observado, neste trabalho também demonstramos aumento da produção de Cer e dHCer nos tumores, mas não de SM e HexCer (figura 11C). Em outro estudo, Bhadwal et al. detectaram 49 espécies de esfingolipídios nas amostras de câncer de mama e relataram que 51% pertenciam a classe de SM e 33% Cer. Entretanto, os autores consideraram no grupo das Cer as subclasses LacCer e DhCer (BHADWAL et al., 2020).

Devido à grande variedade de esfingolipídios detectados nas nossas amostras de tecidos, fizemos uma análise multivariada para determinar quais metabólitos foram alterados significativamente no tumor em relação ao tecido normal. Na figura 12A representamos esta análise por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), no qual observamos uma separação de clusters entre os grupos analisados, enfatizando que o metabolismo de esfingolipídios é influenciado no desenvolvimento tumoral de mama.

Assim como para na formação de EICs, também selecionamos as espécies de esfingolipídios que apresentaram *score VIP* maior que 1.5 (figura 12B), sugerindo que esses metabólitos são os que apresentam mais distinção entre os grupos analisados, como também, podem ser os principais candidatos a biomarcadores, relacionados com a via dos esfingolipídios, no câncer de mama.

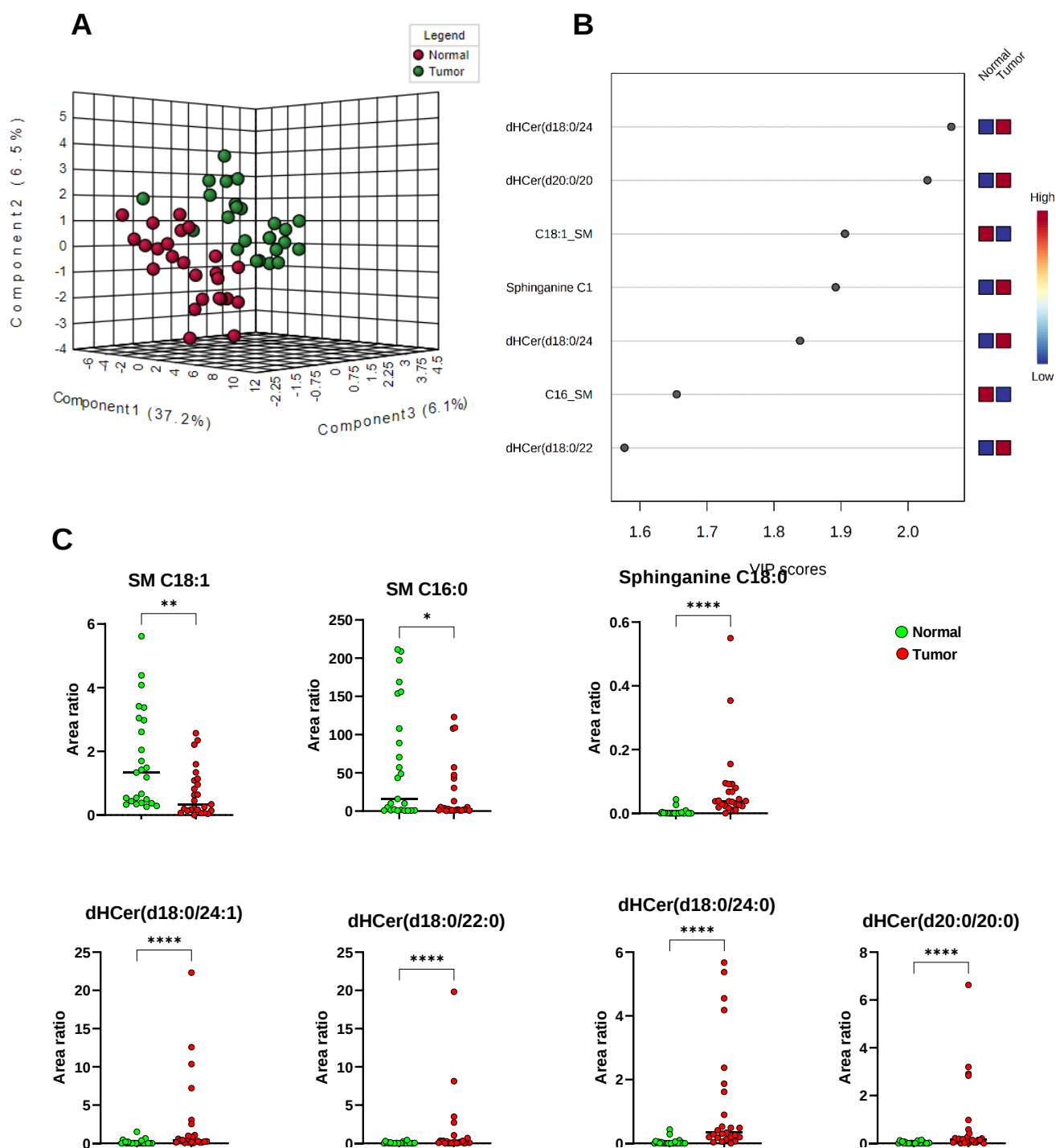


Figura 12. Análise discriminante das espécies de esfingolípídios entre tumor e tecido normal.

(A) Análise de componente principal (PCA) de todas as variáveis detectadas na via dos esfingolípídios. (B) Análise de Escore VIP, selecionando as espécies de esfingolípídios com índice > 1,5. (C) Quantificação relativa das espécies de esfingolípídios selecionados no Escore VIP, representados pela razão entre a área dos analitos e área do padrão interno (area ratio). Diferenças estatísticas para * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dessa forma, expressamos as quantidades relativas destes esfingolípídios selecionados no *escore VIP* comparando as amostras tumoral e do tecido normal. Observamos que as quantidades de SM- C18:1 e C16:0 estavam diminuídas significativamente nos tumores mamários, enquanto as quantidades de DhCer- C18:0/24:0, C18:0/24:1, C18:0/22:0, C20:0/20:0 e da esfinganina C18:0 estavam aumentadas significativamente nos tecidos de tumores (figura 12C).

Em estudo semelhante, Bhadwal et al. também utilizou a metabolômica como ferramenta para identificar novos biomarcadores lipídicos no câncer de mama. Os autores identificaram, através de PLS-DA e *escore VIP* > 1,0, sete possíveis esfingolípídios como possíveis biomarcadores para o câncer de mama: CerP (23:0), CerP (23:1), S1P (20:2), S1P (22:2), SM (18:0/24:2), SM (18:2/22:0) e SM (40:1). A maioria desses lipídios estiveram aumentados no tumor, com exceção das espécies SM (18:2/22:0) e (40:1) que aumentaram no tecido normal (BHADWAL et al., 2020).

A produção dos esfingolípídios também foi analisada por subtipo de tumor através da frequência relativa das classes destes lipídios (figura 13A). Demonstramos que o perfil destes metabólitos foi relativamente diferente entre os subtipos de tumores, salientando a maior produção de SM (88,76%) nos tumores do tipo Luminal A, enquanto tivemos redução destas SM (63,30%) no subtipo Luminal B, mas aumento de DhCer (15,23%) e LacCer (7,58%). Interessantemente, o perfil metabólico de esfingolípídios no subtipo HER-2 foi muito diferente dos demais, com predominância de produção relativa de DhCer (66,56%).

Na análise multivariada (figura 13B) demonstramos que o subtipo HER-2 é mais homogêneo na clusterização de todas suas variáveis e se diferencia dos clusters de Luminal A e B. No entanto, observamos também diferença importantes nos clusters de Luminal A e B, corroborando com os dados observados da abundância relativa dos seus metabólitos de esfingolípídios. Através da construção do *escore VIP* e selecionando as espécies com índices superiores a 1.5, observamos predominância das espécies da classe das DhCer sugerindo sua importante associação com estes subtipos de tumores de mama (figura 13C).

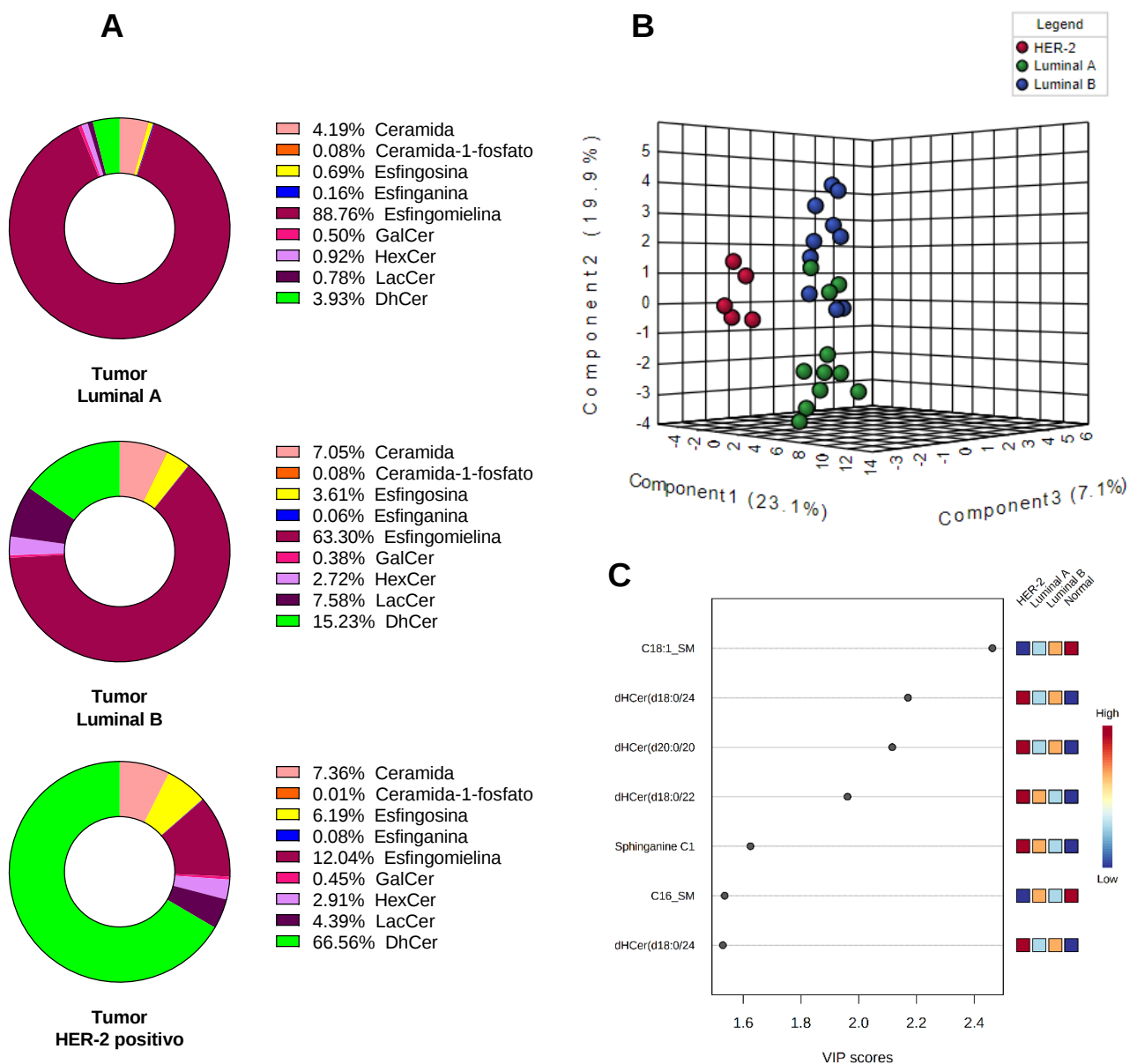


Figura 13. Determinação do perfil de produção de esfingolipídios nos subtipos de tumor de mama. (A) Frequência relativa das classes de esfingolipídios nos tumores Luminal A, Luminal B e HER-2. **(B)** Análise do componente principal (PCA) de todas as variáveis detectadas na via dos esfingolipídios representados em clusters por subtipos de tumor. **(C)** Análise de escore VIP, selecionando as espécies de esfingolipídios com índice > 1,5. dHCer, diidroceramida, LacCer, lactosilceramida; HexCer, Hexoglicosilceramida; GalCer, galactosilceramida.

O perfil de esfingolipídios também foi analisado no soro pré- e pós-cirurgia de mastectomia e foram comparados com o soro dos controles saudáveis. Observamos que no soro controle a composição de espécies de esfingolipídios era principalmente SM (29,7%) e DhCer (35,7%) (figura 14A). No entanto, o perfil de soro pré-cirúrgico dos subtipos Luminal A (figura 14B) e B (figura 14C), demonstrou aumento nas quantidades de SM (87,6% e 67,5%, respectivamente), que pode estar relacionado com a influência do tecido tumoral, pois foi demonstrado grandes quantidades destes lipídios no tecido tumoral (figura 13). Entretanto, após a cirurgia, verificamos que os soros dos subtipos Luminal A e B possuíam um perfil de esfingolipídios semelhante ao controle (figura 14B e 14C).

Por outro lado, no soro pré-cirúrgico do subtipo HER-2 observamos maior expressão de DhCer (39,8%) (figura 14D) e mais ainda no soro pós-cirúrgico (73,2%). Analisando o perfil clínico das pacientes do grupo HER-2, percebemos que duas dessas pacientes não fizeram quimioterapia adjuvante e as outras duas fizeram tratamento com quimioterapia anti-HER-2; então, separando essas pacientes de acordo com o tratamento, vimos que as pacientes sem quimioterapia apresentaram maiores frequências relativas de DhCer (74,7%) no soro pós-cirúrgico, enquanto as pacientes que fizeram a quimioterapia tinham perfil semelhante aos controles (figura 14E).

Esses resultados sugerem que o receptor HER-2 pode estar influenciando o metabolismo dos esfingolipídios sistêmico e não somente no tecido tumoral, principalmente no ponto de conversão de DhCer para Cer, devido ao acúmulo daquele substrato. Outra observação que pode fundamentar essa hipótese é que as pacientes que fizeram terapia anti-HER2 tiveram diminuição da quantidade de DhCer e aumento da formação de Cer, indicando o restabelecimento desta via metabólica.

Outro dado interessante é que no soro das nossas pacientes foi detectado esfingosina-1-fosfato (S1P) (figura 14), mas não observamos este metabolito nas amostras de tecido. Porém, Nagahashi et al. e Bhadwal et al. reportaram quantidades aumentadas de S1P nos tumores mamários comparados com tecidos normais (BHADWAL et al., 2020; NAGAHASHI et al., 2016).

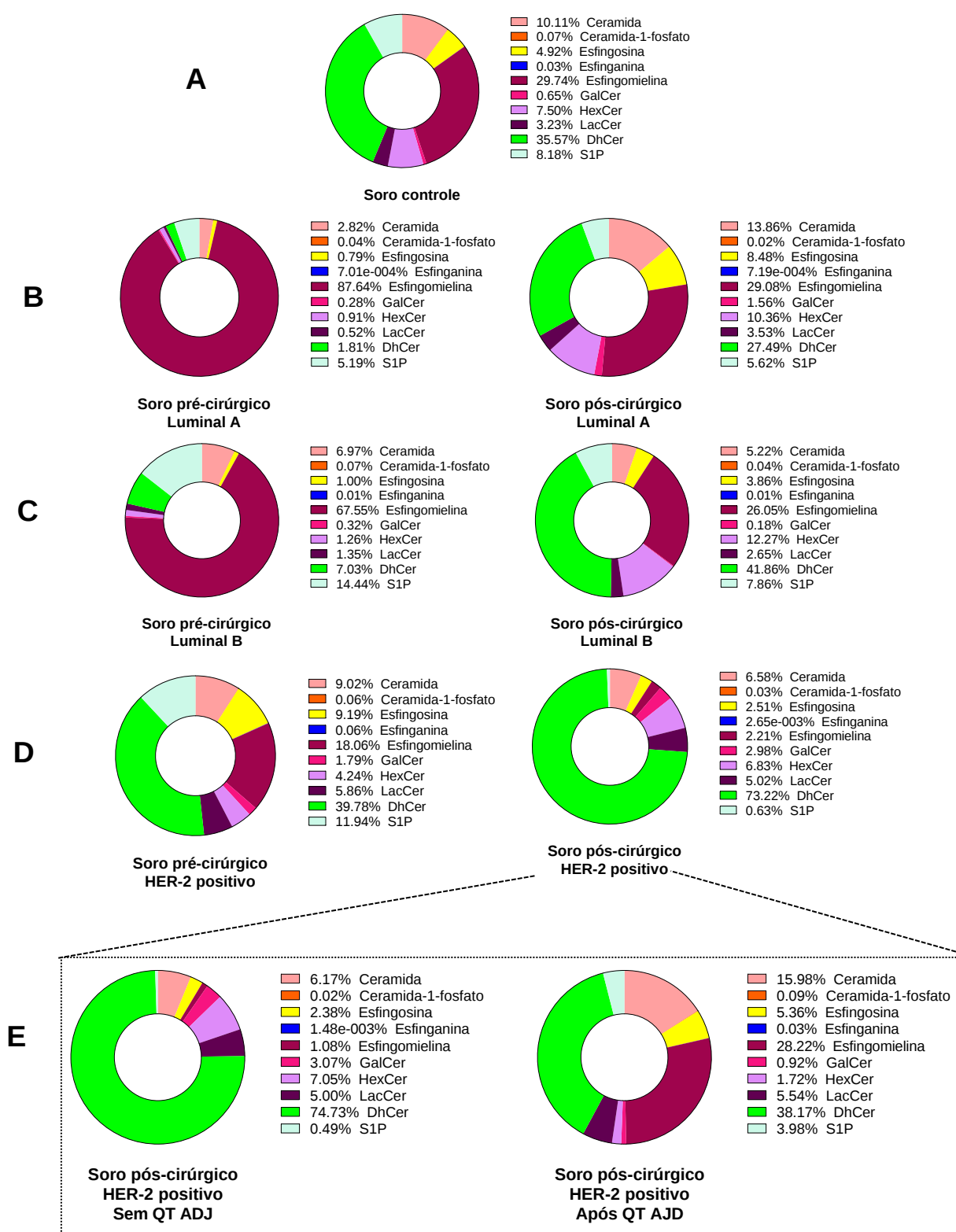


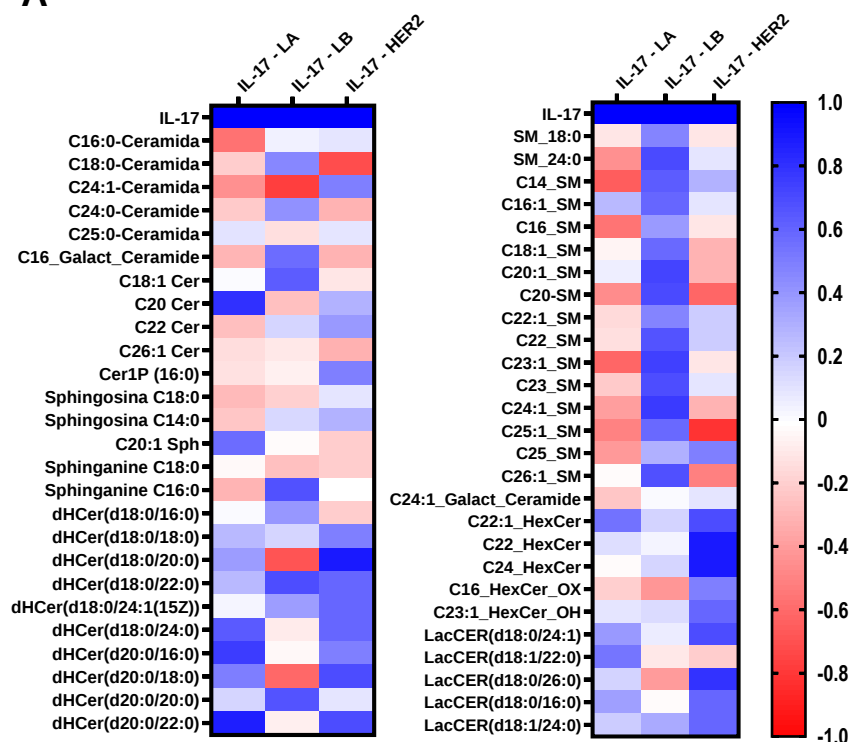
Figura 14. Frequência relativa das classes de esfingolipídios no soro pré- e pós-cirúrgico. (A) Perfil do soro de indivíduos saudáveis (controle). **(B)** Perfil de soro pré- e pós-cirúrgico de pacientes do subtipo Luminal A. **(C)** Perfil de soro pré- e pós-cirúrgico das pacientes do subtipo Luminal B. **(D)** Perfil do soro pré- e pós-cirúrgico de pacientes HER-2 positivo. **(E)** Perfil de soro pós-cirúrgico de pacientes do subtipo HER-2 com ou sem quimioterapia adjuvante anti-HER2.

Semelhante aos dados de EICs, também verificamos as correlações entre a produção de IL-17 e a formação de espécies de esfingolipídios no tecido tumoral. Na figura 15A observamos todas as correlações destes lipídios com a citocina IL-17 por subtipo de tumor mamário e na figura 15B estão listadas os valores de correlações de spearman (r_s) e sua significância estatística (p). Dessa forma, demonstramos que no subtipo Luminal A tivemos correlações positivas, moderadas e fortes, e significativas entre IL-17 e as DhCer C18:0/24:0, C20:0/16:0 e C20:0/22:0, bem como com a Cer C20:0. Também, nesse subtipo de tumor obtivemos uma correlação negativa, moderada e significativa com a SM C14:0.

No subtipo Luminal B, observamos correlações positivas, moderadas e fortes entre IL-17 e espécies de SMs. Além dessas, vimos outras correlações positivas, moderadas e fortes com as DhCer C18:0/22:0 e C20:0/20:0 e esfinganina C18:0. De outra forma, a IL-17 apresentou correlações negativas com a Cer C24:1 e DhCer C18:0/20:0.

Na análise do subtipo HER-2 observamos algumas correlações positivas e moderadas entre IL-17 e DhCer. Além de correlações positivas e fortes especificamente com DhCer C18:0/20:0, HexCer C22:0 e C24:0 e LacCer C18:0/26:0. Porém, semelhante aos resultados com EICs, não observamos correlações significativas entre a IL-17 e os esfingolipídios identificados, provavelmente pelo n experimental pequeno e a baixa produção de IL-17 no subtipo de tumor HER-2.

Ainda, analisando as correlações entre os subtipos de tumores, observamos que em todos os grupos a IL-17 apresentou correlação positiva com algumas espécies de DhCer. Além disso, houve apenas duas correlações com a formação de Cer, e uma delas foi negativa. Esses dados sugerem a influência da inflamação no microambiente tumoral, especificamente pela produção de IL-17, com a modulação do metabolismo de esfingolipídios tecidual, sobretudo inibindo a formação de Cer que têm atividades pró-apoptótica (RAO et al., 2013). Neste sentido, essa correlação com o metabolismo de esfingolipídios pode ser um possível mecanismo pelo qual a IL-17 conduz à progressão tumoral.

A**B**

	Analito 1	Analito 2	Coefficiente de correlação (r_s)	Valor de p
Luminal A	IL-17	C20 Cer	0,80	0,003
	IL-17	C14_SM	-0,63	0,040
	IL-17	dHCer(d18:0/24:0)	0,65	0,037
	IL-17	dHCer(d20:0/16:0)	0,76	0,009
	IL-17	dHCer(d20:0/22:0)	0,88	0,001
Luminal B	IL-17	C24:1-Ceramida	-0,76	0,015
	IL-17	Sphinganine C16:0	0,68	0,035
	IL-17	SM_24:0	0,71	0,027
	IL-17	C20:1_SM	0,73	0,020
	IL-17	C20-SM	0,71	0,027
	IL-17	C22_SM	0,67	0,039
	IL-17	C23:1_SM	0,75	0,017
	IL-17	C23_SM	0,70	0,031
	IL-17	C24:1_SM	0,77	0,013
	IL-17	C26:1_SM	0,68	0,035
	IL-17	dHCer(d18:0/20:0)	-0,67	0,039
	IL-17	dHCer(d18:0/22:0)	0,70	0,031
	IL-17	dHCer(d20:0/20:0)	0,67	0,039

Figura 15. Análises das correlações de Spearman entre IL-17 e espécies de esfingolipídios detectados nos subtipos de tumores de mama. (A) Matrizes de correlação para os subtipos Luminal A (LA), Luminal B (LB) e HER-2. **(B)** Os dados individuais dos coeficientes de correlação rho de Spearman (r) e valor de p estão expressos na tabela em anexada, considerando diferenças estatísticas significativas para $p < 0,05$.

6.4. Potencial diagnóstico dos candidatos a biomarcadores no câncer de mama

A curva ROC é um método estatístico utilizado para avaliar a eficácia de biomarcadores em distinguir dois grupos (BHADWAL et al., 2020). A área sobre a curva (AUC) é um indicativo para resumir a precisão geral do teste. Assim, a AUC assume valores de 0 a 1, em que 0 significa um teste perfeitamente impreciso, enquanto 1 significa um teste perfeitamente preciso. Resumidamente, podemos fazer as seguintes interpretações: AUC de 0,5 sugere nenhuma discriminação entre os grupos, ou seja, o teste não tem capacidade de identificar os pacientes que têm ou não determinada condição. Já valores de AUC entre 0,7 e 0,8 são considerados aceitáveis e de relevância clínica, os de 0,8 a 0,9 são excelentes e acima de 0,9 são considerados excepcionais (MANDREKAR, 2010).

Para determinar o potencial diagnóstico da IL-17, dos EICs e das espécies de esfingolipídios no câncer de mama e seus subtipos, utilizamos o valor de importância do escore VIP acima de 1,5. Dessa forma, fizemos análises univariadas de curva ROC verificando a AUC para avaliar a acurácia dos biomarcadores comparando os tecidos tumorais com os normais (figura 16). Nos gráficos também representamos o intervalo de confiança de 95% entre parênteses embaixo do valor de AUC, os valores de cutoff (ponto vermelho) e entre parênteses estão os percentuais de especificidade e sensibilidade, respectivamente. Além da significância estatística (p).

Nas análises direcionadas para IL-17, notamos que na comparação de tecido tumoral com controle, um bom potencial diagnóstico com AUC de 0,8, sensibilidade de 80% e especificidade de 90% foi atribuído à citocina (figura 16A). Quando correlacionamos os subtipos de tumores, vimos que para os tumores luminal A e B, a IL-17 continua sendo um bom biomarcador com AUC maior que 0,8 para LA (figura 16B), e AUC de 0,9 para luminal B (figura 16C) com valor significativo na estatística. Porém, para o subtipo HER-2, a IL-17 não parece ser um bom biomarcador com uma AUC menor que 0,7 (figura 16D).

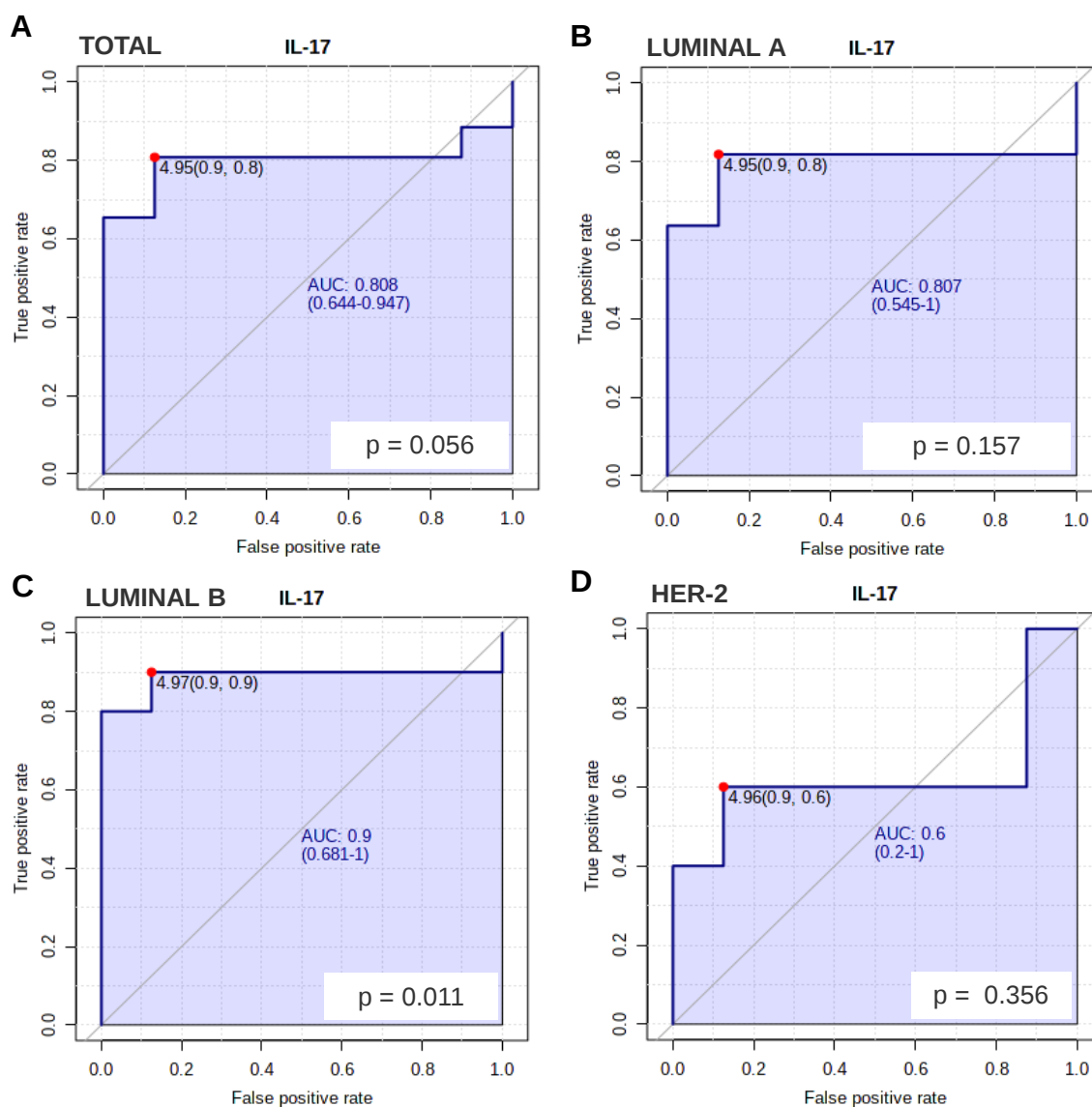


Figura 16. Curvas ROC para avaliar o potencial diagnóstico da IL-17 no câncer de mama. (A) Análise de valor para tumor de mama total. **(B)** Análise do valor para o subtipo Luminal A. **(C)** Análise do valor para o subtipo Luminal B. **(D)** Análise do valor para o subtipo HER-2. As curvas comparam tecido tumoral e tecido controle de pacientes saudáveis. Pontos em vermelho indicam o *cutoff* e entre parênteses os valores de especificidade e sensibilidade, respectivamente. O valor de AUC está representado nos gráficos, como também os intervalos de confiança de 95% representado entre parênteses embaixo do valor de AUC. Valor de significância estatístico para $p < 0,05$ (indicado nos gráficos).

Na figura 17 representamos as curvas ROC e AUC dos EICs TXB₂ e 11-HETE que foram indicados na análise de importância no escore VIP para os tecidos tumorais e normal. Dessa forma, demonstramos que o TXB₂ possui excelente valores de AUC ($> 0,8$) para a análise de tumor total (figura 17A) e dos subtipos Luminal A (figura 17B), B (figura 17C) e HER-2 (figura 17D), com especificidade e

sensibilidade variando de 80 a 90%. Além disso, o subtipo HER-2 apresentou a maior AUC (0,96) com especificidade de 100% e sensibilidade de 80%. Na análise da força de representação do 11-HETE, observamos que todas as curvas ROC apresentaram $AUC > 0,7$ (figura 17E, 17F, 17G e 17H), como também, o subtipo tumoral HER-2 obteve o melhor resultado de AUC (0,92).

Esses dados sugerem que TXB_2 e 11-HETE têm potencial como biomarcadores para o câncer de mama, porém não discriminam os subtipos tumorais, visto que em todas as análises as curvas ROC apresentaram resultados aceitáveis e excelentes ($AUC > 0,7$ e $p < 0,05$), indicando que independente do tipo de câncer, esses biomarcadores são expressos e representam o estado inflamatório do microambiente tumoral, sendo que nestes tecido há aumento da produção de TXB_2 e diminuição da produção de 11-HETE quando comparados com os tecidos normais.

Para analisar a força de representação de biomarcadores dos esfingolipídios, optamos por reunir os dados estatísticos em forma de tabela (tabela 8), pois temos muitas espécies destes lipídios selecionados no escore VIP. Assim, observamos que as SM C16:0 e C18:1 nos tumores totais ou por subtipo apresentaram, na maioria, $AUC > 0,9$ e $p < 0,05$. Interessante, nos tumores HER-2 as análises para estas duas SM foram perfeitamente precisas com $AUC = 1$. A esfinganina C18:0 apresentou $AUC > 0,7$ nos tumores total e no subtipo HER-2, porém somente nos tumores totais apresentou p significativo ($p = 0,02$). Nos subtipos Luminal A e B, a AUC da esfinganina foi menor que 0,5, sendo consideradas inadequadas.

Por outro lado, as espécies de dHCer apresentaram $AUC < 0,7$ nos tumores totais e nos subtipos luminais, com exceção da dHCer (d18:0/22:0) que obteve AUC igual a 0,7 e valor de $p > 0,05$ nos tumores luminais A, e a dHCer (d20:0/20:0) que obteve AUC de 0,84 e valor de p significativo igual a 0,015 nos tumores luminais B. Entretanto, apenas as dHCer d18:0/24:0 e d18:0/24:1 apresentaram $AUC > 0,8$ nos tumores HER-2, porém o valor de p não foi significativo. Possivelmente, há uma tendência de que essas espécies de dHCer sejam potenciais biomarcadores para o HER-2, visto que foi a classe mais produzida nesse subtipo de tumor.

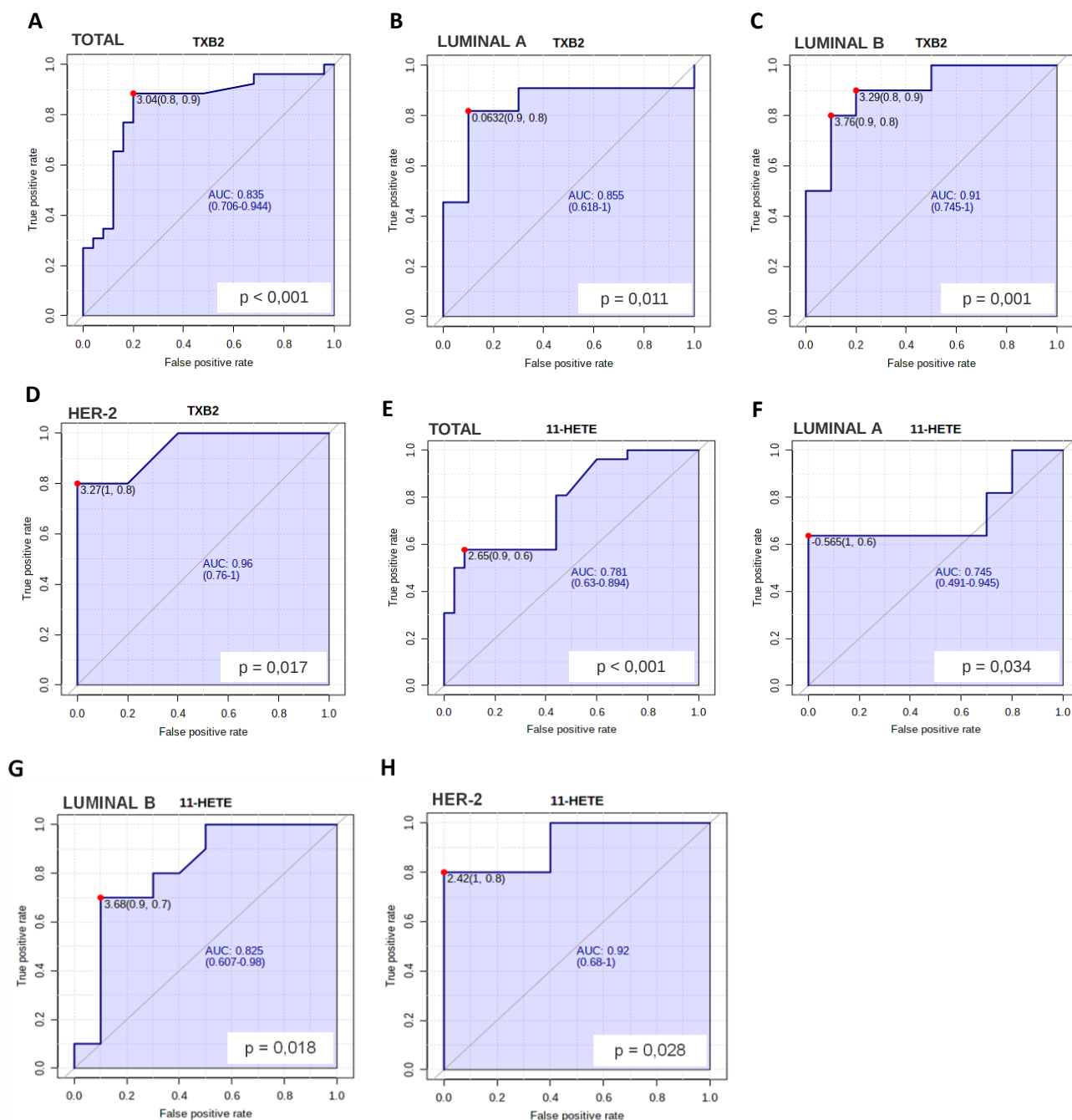


Figura 17. Curvas ROC para avaliar o potencial diagnóstico de eicosanoides no câncer de mama.

Análise de valor de TXB2 para **(A)** tumor de mama total; **(B)** para o subtipo Luminal A; **(C)** para o subtipo Luminal B e **(D)** para o subtipo HER-2. Como também, Análise de valor de 11-HETE para **(E)** tumor de mama total; **(F)** para o subtipo Luminal A; **(G)** para o subtipo Luminal B e **(H)** para o subtipo HER-2. As curvas comparam tecido tumoral e tecido normal pareado dos próprios pacientes. Pontos em vermelho indicam o *cutoff* e entre parênteses os valores de especificidade e sensibilidade, respectivamente. O valor de AUC está representado nos gráficos como também os intervalos de confiança de 95% representado entre parênteses. Valor de significância estatístico para $p < 0,05$ (indicado nos gráficos).

Bhadwal et al. realizaram análises de curva ROC dos esfingolípídios entre tecido tumoral e tecido normal. Somente as espécies CerP (23:0), CerP (23:1), S1P (20:2), S1P (22:2) apresentaram AUC > 0,7. E as únicas curvas que apresentaram p significativo (< 0,05) foram as de CerP (23:1), S1P (20:2). Apesar das limitações estatísticas apresentadas nos resultados individuais da curva ROC, os autores fizeram diversas combinações entre as espécies lipídicas e geraram análises multivariadas de curva ROC para aumentar o desempenho dos biomarcadores (BHADWAL et al., 2020).

Tabela 8: Resultados das curvas ROC para avaliar o potencial dos esfingolípídios como biomarcadores (em verde AUC > 0.7 e p < 0,05)

METABÓLITO	AUC	IC 95%	CUTOFF	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	VALOR DE p
TODOS OS TUMORES						
SM C16:0	0.845	0.731 - 0.934	4.02	0,80	0,70	< 0,001
SM C18:1	0.941	0.874 - 0.991	3.02	0,90	0,90	< 0,001
Esfinganina C18:0	0.755	0.594 - 0.887	0.643	0,80	0,80	0,02
dHCer(d18:0/22:0)	0.557	0.383 - 0.72	1.31	0,80	0,60	0,481
dHCer(d18:0/24:0)	0.662	0.517 - 0.805	1.64	0,70	0,70	0,063
dHCer(d18:0/24:1(15Z))	0.578	0.393 - 0.74	1.73	0,90	0,50	0,576
dHCer(d20:0/20:0)	0.695	0.512 - 0.845	1.18	0,80	0,70	0,038
LUMINAL A						
SM C16:0	0.964	0.864 - 1.0	0.313	0,90	1,0	< 0,001
SM C18:1	0.964	0.873 - 1.0	0.624	0,90	1,0	0,005
Esfinganina C18:0	0.464	0.195 - 0.732	0.0317	0,60	0,60	0,583
dHCer(d18:0/22:0)	0.70	0.468 - 0.959	0.0355	0,90	0,70	0,082
dHCer(d18:0/24:0)	0.675	0.455 - 0.898	0.0343	0,60	0,90	0,171
dHCer(d18:0/24:1(15Z))	0.509	0.245 - 0.771	0.652	1,0	0,40	0,449
dHCer(d20:0/20:0)	0.627	0.377 - 0.882	0.009	0,70	0,60	0,242
LUMINAL B						
SM C16:0	0.90	0.73 - 1.0	3.88	1,0	0,80	0,001
SM C18:1	0.97	0.855 - 1.0	3.18	1,0	0,80	< 0,001
Esfinganina C18:0	0.363	0.125 - 0.625	0.896	0,60	0,30	0,566
dHCer(d18:0/22:0)	0.595	0,33 - 0,84	0.834	0,80	0,60	0,834
dHCer(d18:0/24:0)	0.675	0.4 - 0.89	2.0	0,60	0,70	0,116
dHCer(d18:0/24:1(15Z))	0.69	0.42 - 0.92	1.88	0,90	0,70	0,098
dHCer(d20:0/20:0)	0.84	0.61 - 0.99	1.36	0,80	0,80	0,015
HER-2						
SM C16:0	1.0	1.0 - 1.0	2.67	1,0	1,0	0,002
SM C18:1	1.0	1.0 - 1.0	1.94	1,0	1,0	< 0,001
Esfinganina C18:0	0.80	0.36 - 1.0	0.326	0,8	0,8	0,417
dHCer(d18:0/22:0)	0.66	0.24 - 0.92	2.12	0,6	0,8	0,758
dHCer(d18:0/24:0)	0.84	0.419 - 1.0	1.91	0,60	1,0	0,171
dHCer(d18:0/24:1(15Z))	0.80	0.4 - 1.0	2.59	1,0	0,80	0,166
dHCer(d20:0/20:0)	0.68	0.32 - 1.0	1.95	0,80	0,60	0,443

Visto que os níveis de dHCer no soro de pacientes HER-2 estiveram aumentados, utilizamos as duas espécies que tiveram AUC > 0.8 no tecido para

análises de curva ROC comparando o soro dos pacientes HER-2 com o dos controles para averiguar se o teste consegue distinguir esses lipídios entre as amostras. Das duas espécies de dhCer, a d18:0/24:0 apresentou AUC = 1.0 com p significativo (figura 18A) e a d18:0/24:1(15Z) (figura 18B) embora tenha apresentado valor de AUC > 0.7, o p não foi significativo. Quando analisamos a concentração da dhCer(d18:0/24:0) nos soros antes e após cirurgia das pacientes HER-2 que receberam ou não imunoterapia, observamos que os níveis dessa espécie estão aumentados no soro pós-cirúrgico das pacientes que não fizeram uso de terapia anti-HER-2 e isso pode estar relacionado à recidiva.

Esses resultados sugerem o potencial biomarcador para a dhCer(d18:0/24:0), dado que os níveis dessa espécie estiveram aumentados nos tecidos tumorais e no soro pré-cirúrgico e após o tratamento com fármaco anti-HER-2, os níveis séricos diminuiriam. A dhCer(d18:0/24:0) pode ser utilizada tanto para o diagnóstico quanto para monitorar e avaliar a eficácia do tratamento em pacientes HER-2 ou até mesmo para monitorar recidivas.

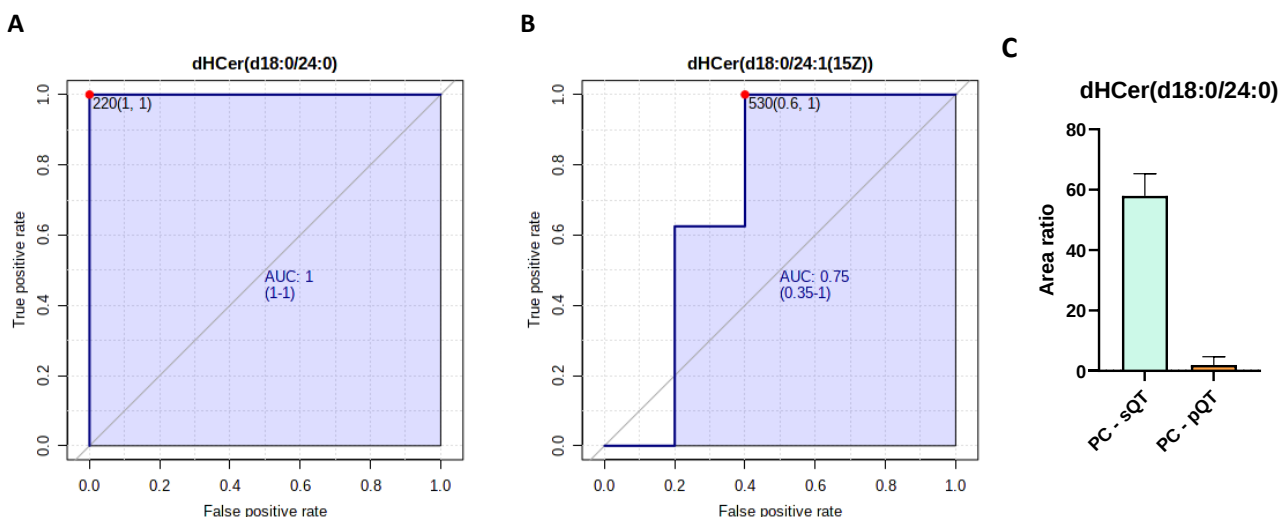


Figura 18. Análise do potencial diagnóstico das dhCer no soro de pacientes HER-2. Análise de valor para dhCer (d18:0/24:0) (A) e para dhCer (d18:0/24:1(15Z)) (B). As curvas comparam o soro pré-cirúrgico de pacientes HER-2 e soro de controles saudáveis. Pontos em vermelho indicam o *cutoff* e entre parênteses os valores de especificidade e sensibilidade, respectivamente. O valor de AUC está representado nos gráficos como também os intervalos de confiança de 95% representado entre parênteses. Valor de significância estatística para $p < 0,05$ (indicado nos gráficos). (C)* Níveis de dhCer (d18:0/24:0) no soro pós-cirúrgico (PC) de pacientes que fizeram quimioterapia adjuvante (pQT) e das que não fizeram (sQT). Não foi possível representar análise estatística pelo número de pacientes (2 por grupo).

Diante dos resultados, podemos dizer que o nosso estudo possui um diferencial, pois investigou possíveis biomarcadores lipídicos tanto da classe dos eicosanoides quanto espécies de esfingolipídios, correlacionando-os com a IL-17 como fator inflamatório. Além disso, investigamos não somente as diferenças entre tumores totais e tecido normal, mas também diferenças entre os subtipos de câncer, o que é pouco reportado pelos trabalhos científicos que estudam biomarcadores lipídicos em câncer de mama.

7. CONCLUSÕES

Neste estudo demonstramos que a produção de IL-17 está aumentada nos tumores mamários e que os níveis séricos da citocina estavam elevados antes do tratamento cirúrgico, mas diminuíram após a cirurgia, sugerindo que o microambiente tumoral influencia a produção de IL-17 tanto a nível tecidual quanto a nível sistêmico e que a citocina pode atuar como fator inflamatório para a progressão da doença. Além disso, apresentamos o potencial diagnóstico da IL-17 como biomarcador para os subtipos luminais do câncer de mama, sobretudo para o luminal B que apresentou níveis mais elevados da citocina.

Mostramos que os EICs, com exceção de 11-HETE, estão aumentados nos tumores mamários e que não houve diferença entre os níveis séricos antes e após cirurgia, inferindo que o metabolismo desses lipídios é um fenômeno específico dos tecidos tumorais e não tem relevância no contexto sistêmico. Além disso, os EICs não apresentaram correlações significativas com a IL-17, inferindo que essas duas vias de produção de mediadores inflamatórios são independentes nos tumores mamários.

Em relação ao metabolismo dos esfingolipídios, identificamos uma ampla gama desses metabólitos no tecido tumoral. Alguns deles apresentaram correlações significativas com a IL-17, sugerindo que a via de sinalização da citocina pode afetar a regulação do metabolismo dos esfingolipídios, induzindo a maior produção de esfingomielinas e diidroceramidas e regulando a formação de ceramidas.

Entre os EICs, o TXB₂ apresentou melhor potencial para biomarcador devido sua expressão aumentada nos tumores mamários. Já 11-HETE também apresentou bom potencial diagnóstico, porém pode ser candidato a biomarcador pela sua ausência no tecido tumoral. Esses mediadores apresentaram ótimos resultados de curva ROC em todos os subtipos de câncer, sugerindo que podem ser possíveis biomarcadores para o câncer de mama independente do tipo de tumor.

Em relação à força de representação dos esfingolipídios, determinamos que independente do subtipo de tumor, as SM C16:0 e C18:1 demonstraram ser os melhores biomarcadores dessa classe para o câncer de mama pela sua expressão diminuída nos tumores. A dHCer (d20:0/20:0) demonstrou ser um potencial biomarcador para o subtipo Luminal B. E a dHCer(d18:0/24:0) apresentou potencial biomarcador para o subtipo HER-2 tanto no tecido quanto no soro.

Assim, os resultados sugerem que esses mediadores lipídicos têm potencial como biomarcadores para o câncer de mama e podem auxiliar no diagnóstico, no monitoramento de progressão da doença bem como avaliar a eficácia do tratamento. Além disso, a diminuição nos níveis séricos de IL-17, SM e dHCer parecem ter relação com a remissão do câncer.

8. DIFICULDADES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das dificuldades do estudo foi obter os fragmentos de tecido a fresco, visto que sempre necessitávamos de um patologista logo que a peça cirúrgica era liberada. Então sempre tínhamos que programar as coletas verificando a disponibilidade desses profissionais, buscando não atrapalhar a rotina de serviço, mas muitas vezes foi inevitável.

Outra dificuldade foi em se obter um número maior de pacientes, principalmente de HER-2 dado que são tumores menos frequentes. Uma limitação para isso foi a pandemia de SARS-CoV-2, pois todas as atividades de pesquisa foram suspensas bem como todas as cirurgias eletivas. Nesse sentido, outra tarefa árdua foi conseguir coletar os soros pós-cirúrgicos dada a dificuldade de reencontrar os pacientes e alguns se recusaram a fazer nova coleta.

Neste estudo observamos que não houve diferença nas concentrações dos lipídios entre tecido normal (fragmento de mama retirado distante da lesão tumoral) e tecido controle das pacientes saudáveis, inferindo que as amostras são muito semelhantes e o tecido normal pode ser utilizado como um controle mais fidedigno por ser da mesma paciente. Um fator limitante para o estudo é que não conseguimos comparar as concentrações de citocinas no tecido tumoral com as do tecido normal, visto que coletamos apenas um fragmento que foi destinado para a quantificação dos lipídios. Como são métodos de processamento diferentes, não foi possível utilizar a mesma amostra.

Nesse contexto, outra limitação foi a diferença de idade entre as pacientes com câncer e as pacientes controles. A maioria das pacientes oncológicas apresentaram mais de 50 anos, enquanto as pacientes saudáveis uma idade inferior a 40 anos. Dado que a idade influencia na composição do tecido mamário, talvez esse seja um fator relevante para as diferenças observadas nas concentrações de citocinas entre os dois grupos. O ideal era que as idades fossem próximas entre os grupos, porém esses procedimentos estéticos são mais realizados por mulheres jovens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKAREEM, I. H.; ZURMI, I. B. Review of hormonal treatment of breast cancer. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 15, n. 1, p. 9–14, 2012.
- AKOGLU, H. User's guide to correlation coefficients. **Turkish Journal of Emergency Medicine**, v. 18, n. 3, p. 91–93, 2018.
- ANDERS, C. K. et al. NIH Public Access. **Semin Oncol.**, v. 36, n. 3, p. 237–249, 2010.
- ARPINO, G. et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Research**, 2004.
- AUNG, T. N. et al. **Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action** *International Journal of Molecular Sciences*, 2017.
- BAHCECIOGLU, G. et al. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. **Acta Biomaterialia**, v. 106, p. 1–21, 2020.
- BAILEY, S. R. et al. Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, p. 1–13, 2014.
- BALLMAN, K. V. Biomarker: Predictive or prognostic? **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 33, p. 3968–3971, 2015.
- BARROS, A. C. S. D. DE; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, 2015.
- BASKAR, R. et al. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.
- BASU, S.; ROSSARY, A.; VASSON, M. P. Role of inflammation and eicosanoids in breast cancer. **Lipid Technology**, v. 28, n. 3–4, p. 60–64, 2016.
- BENEVIDES, L. et al. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. **European Journal of Immunology**, 2013.
- BENEVIDES, L. et al. IL17 promotes mammary tumor progression by changing the behavior of tumor cells and eliciting tumorigenic neutrophils recruitment. **Cancer Research**, v. 75, n. 18, p. 3788–3799, 2015.
- BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. n. 2, 2016.
- BHADWAL, P. et al. LC-HRMS based approach to identify novel sphingolipid biomarkers in breast cancer patients. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.
- BIE, Q. et al. **IL-17B: A new area of study in the IL-17 family** *Molecular Immunology*, 2017.
- BOOJAR, M. M. A.; BOOJAR, M. M. A.; GOLMOHAMMAD, S. Ceramide pathway: A novel approach to cancer chemotherapy. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 237–244, 2018.

BORIN, T. F. et al. Arachidonic acid metabolite as a novel therapeutic target in breast cancer metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 1–23, 2017.

BOZZA, P. T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205–213, 2011.

BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. **American Journal of Clinical Oncology**, 2016.

BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182–201, 2014.

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 213–221, 2018.

CHATTERJEE, S.; BALRAM, A.; LI, W. Convergence: lactosylceramide-centric signaling pathways induce inflammation, oxidative stress, and other phenotypic outcomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–25, 2021.

CHECKA, C. M. et al. The relationship of mammographic density and age: Implications for breast cancer screening. **American Journal of Roentgenology**, v. 198, n. 3, p. 292–295, 2012.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. **Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle** Immunity, 2013.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 58–66, 2013.

CHEN, W. C. et al. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. **Histopathology**, 2013.

CHEN, X.-H.; HUANG, S.; KERR, D. Biomarkers in clinical medicine. **IARC Sci Publ**, v. 163, p. 303–322, 2011.

CHEN, X. et al. Plasma lipidomics profiling identified lipid biomarkers in distinguishing early-stage breast cancer from benign lesions. **Oncotarget**, v. 7, n. 24, p. 36622–36631, 2016.

CHOW, M. T.; MÖLLER, A.; SMYTH, M. J. **Inflammation and immune surveillance in cancer** *Seminars in Cancer Biology*, 2012.

CÍFKOVÁ, E. et al. Correlation of lipidomic composition of cell lines and tissues of breast cancer patients using hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and multivariate data analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 31, n. 3, p. 253–263, 2017.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Palavras-chave Neoplasias da mama Classificação Imunoistoquímica Prognóstico. p. 74645–140, [s.d.].

COCCHI, M.; BIANCOLILLO, A.; MARINI, F. **Chemometric Methods for Classification and Feature Selection**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 82

COCHAUD, S. et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 3456,

2013.

COUGHLIN, S. S.; CYPEL, Y. Breast cancer metastasis and drug resistance: Progress and prospects. **Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance: Progress and Prospects**, p. 1–413, 2012.

DAI, X. et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. **Am J Cancer Res**, v. 5, n. 10, p. 2929–2943, 2015.

DE LA CRUZ-MERINO, L. et al. Breast Cancer Immunology and Immunotherapy: Current Status and Future Perspectives. 2017.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: Insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 4, p. 171–179, 2005.

DUFFY, M. J. et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 284–298, 2017.

EGHLIMI, R. et al. Triple Negative Breast Cancer Detection Using LC-MS/MS Lipidomic Profiling. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 6, p. 2367–2378, 2020.

EKAMBARAM, P. et al. The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: An emerging paradigm in cancer progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 3–4, p. 397–408, 2011.

ELIYATKIN, N. et al. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. **Journal of Breast Health**, v. 11, n. 2, p. 59–66, 2015.

ENGLISH, D. P.; ROQUE, D. M.; SANTIN, A. D. HER2 Expression Beyond Breast Cancer: Therapeutic Implications for Gynecologic Malignancies. [s.d.].

ESCRIBÁ, P. V. et al. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. **Progress in Lipid Research**, 2015.

ESSER-VON BIEREN, J. Immune-regulation and -functions of eicosanoid lipid mediators. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 11, p. 1177–1191, 2017.

FABRE, J. et al. Targeting the Tumor Microenvironment: The Protumor Effects of IL-17 Related to Cancer Type. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

FCECON. **Relatório Anual de Gestão 2019**. Disponível em: <<http://www.fcecon.am.gov.br/institucional/acesso-a-informacao/relatorios-de-gestao/>>.

FICHTALI, K. et al. Serum Lipidomic Profiling in Breast Cancer to Identify Screening, Diagnostic, and Prognostic Biomarkers. **BioResearch Open Access**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2020.

FINETTI, F. et al. Progression and Immunity. **Biology**, v. 9, n. 434, p. 1–26, 2020.

FRAGOMENI ET AL. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am.**, v. 27, n. 1, p. 1–29, 2018.

FRANCESCHINI, G. et al. New trends in breast cancer surgery: a therapeutic approach increasingly efficacy and respectful of the patient. **G Chir**, v. 36, n. 4, p. 145–152, 2015.

GALVÃO, A. F. et al. Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3613–3623, 2016.

GAULT, C. R.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 688, p. 1–23, 2010.

GHOSH, J.; MYERS, C. E. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13182–13187, 1998.

GOMES, R. N.; SOUZA, F. DA C.; COLQUHOUN, A. Eicosanoids and cancer. **Clinics**, v. 73, n. 17, p. 1–10, 2018.

GREENE, E. R. et al. Regulation of Inflammation in Cancer by Eicosanoids Emily. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 96, n. 0, p. 27–36, 2011.

GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, v. 64, n. 2, 2013.

HAAKENSEN, V. D. **Biology of the normal breast : Relation to mammographic density and risk of breast cancer**. [s.l: s.n.].

HADA, M. et al. Prediagnostic serum levels of fatty acid metabolites and risk of ovarian cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cancer screening trial. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 28, n. 1, p. 189–197, 2019.

HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 23–32, 2018.

HARIZI, H.; CORCUFF, J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 10, p. 461–469, 2008.

HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. **Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge** **Clinical Anatomy**, 2013.

HILVO, M. et al. Monounsaturated fatty acids in serum triacylglycerols are associated with response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 134, n. 7, p. 1725–1733, 2014.

HIRATA, T.; NARUMIYA, S. **Prostanoids as Regulators of Innate and Adaptive Immunity**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 116

HONN, K. et al. 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 13, n. 3–4, p. 365–396, 1994.

HOWE, L. R. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, 2007.

HU, C.; WANG, M.; HAN, X. Shotgun lipidomics in substantiating lipid peroxidation in redox biology: Methods and applications. **Redox Biology**, v. 12, n. March, p. 946–955, 2017.

HU, T.; ZHANG, J. L. Mass-spectrometry-based lipidomics. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 1, p. 351–372, 2018.

HUO, C. W. et al. High mammographic density in women is associated with protumor inflammation. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2018.

HUSS, R. **Biomarkers**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

IKAWA, H. et al. Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 59, n. 2, p. 360–366, 1999.

INCA. **Estimativas 2020 - Incidências de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

INCA. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>.

INMAN, J. L. et al. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. **Development**, v. 142, n. 6, p. 1028–1042, 2015.

IYER, S. V. et al. Understanding the Role of Keratins 8 and 18 in Neoplastic Potential of Breast Cancer Derived Cell Lines. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2013.

JALES, R. M. **ANATOMIA ULTRASSONOGRÁFICA DA MAMA**. Disponível em: <<https://www.fcm.unicamp.br/drpixel/conteudo/anatomia-ultrassonografica-da-mama>>.

Jl, Y. et al. The relationship between breast density, age, and mammographic lesion type among Chinese breast cancer patients from a large clinical dataset. **BMC Medical Imaging**, v. 21, n. 1, p. 1–6, 2021.

JIANG, N. et al. Potential plasma lipid biomarkers in early-stage breast cancer. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 11, p. 1657–1666, 2017.

JIANG, W. G. et al. Reduction of isoforms of 15-lipoxygenase (15-LOX)-1 and 15-LOX-2 in human breast cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 74, n. 4, p. 235–245, 2006.

JIANG, W. G.; DOUGLAS-JONES, A. G.; MANSEL, R. E. Aberrant expression of 5-lipoxygenase-activating protein (5-LOXAP) has prognostic and survival significance in patients with breast cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 74, n. 2, p. 125–134, 2006.

JIANG, W. G.; DOUGLAS-JONES, A.; MANSEL, R. E. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 69, n. 4, p. 275–281, 2003.

JOHNSON, A. M.; KLECZKO, E. K.; NEMENOFF, R. A. Eicosanoids in Cancer: New Roles in Immunoregulation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. November, p. 1–11, 2020.

JUNG, K. J. et al. Duration of ovarian hormone exposure and gynecological cancer risk in Korean women: The Korean Heart Study. **Cancer Epidemiology**, v. 41, p. 1–7, 2016.

KABEL, A. M. Tumor markers of breast cancer: New perspectives. 2017.

KALRA, J.; EDWARDS, L. A. Breast Cancer Therapies Present and Future. **Journal of Cancer Therapy**, v. 3, p. 1140–1150, 2012.

KAMIŃSKA, M. et al. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015.

KAWAGUCHI, K. et al. Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

KIM, E. et al. An antitumorigenic role for murine 8S-lipoxygenase in skin carcinogenesis. **Oncogene**, v. 24, n. 7, p. 1174–1187, 2005.

KIM, I. C. et al. Lipid profiles for HER2-positive breast cancer. **Anticancer Research**, v. 33, n. 6, p. 2467–2472, 2013.

KIM, R. Cancer Immunoediting: From Immune Surveillance to Immune Escape. In: **Cancer Immunotherapy**. [s.l: s.n.].

KNAPP, P. et al. Unique roles of sphingolipids in selected malignant and nonmalignant lesions of female reproductive system. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

KOBAYASHI, K.; OMORI, K.; MURATA, T. Role of prostaglandins in tumor microenvironment. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 2–3, p. 347–354, 2018.

KOCHEL, T. J.; GOLOUBEVA, O. G.; FULTON, A. M. Upregulation of cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 (COX-2/PGE2) pathway member multiple drug resistance-associated protein 4 (MRP4) and downregulation of prostaglandin transporter (PGT) and 15-prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in triple-negative breast. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 10, p. 61–70, 2016.

KORT, W. J. et al. Eicosanoids in breast cancer patients before and after mastectomy. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 45, n. 4, p. 319–327, 1992.

KUMAR ET AL. PRIMARY STROMAL SARCOMA OF ENTITY BREAST: A RARE Introduction : Case Report : Discussion : **IRANIAN JOURNAL OF PATHOLOGY**, v. 11, n. 5, p. 469–473, 2016.

LAAMIRI, F. Z. et al. Risk Factors for Breast Cancer of Different Age Groups : Moroccan Data ? **Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 5, n. February, p. 79–87, 2015.

LACHKAR, F. et al. Dihydroceramides: Their emerging physiological roles and functions in cancer and 2 metabolic diseases. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 320, n. 1, p. E122–E130, 2020.

LADOIRE, S. et al. Positive impact of autophagy in human breast cancer cells on local immunosurveillance. **ONCOIMMUNOLOGY**, v. 5, n. 6, p. 1–3, 2016.

LI, H. et al. Inhibiting breast cancer by targeting the thromboxane A2 pathway. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2017.

LI, X.; TAI, H. H. Activation of Thromboxane A2 Receptor (TP) Increases the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein -1 (MCP-1)/Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (CCL2) and Recruits Macrophages to Promote Invasion of Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

LIU, Y.-Y.; LI, Y.-T. Ceramide Glycosylation Catalyzed by Glucosylceramide Synthase and Cancer Drug Resistance. **Advances in Cancer Research**, v. 117, p. 59–89, 2013.

LUKONG, K. E. **Understanding breast cancer – The long and winding road**BBA Clinical, 2017.

LUO, Y.; LIU, J. Y. Pleiotropic Functions of Cytochrome P450 Monooxygenase-Derived Eicosanoids in Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. October, p. 1–13, 2020.

MACIAS, H.; HINCK, L. Mammary Gland Development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 533–557, 2013.

MAKKI, J. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. **Clinical Medicine Insights: Pathology**, 2015.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 10, p. 955–960, 2010.

MANDREKAR, J. N. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1315–1316, 2010.

MATHENGE, E. G. et al. Core Needle Biopsy of Breast Cancer Tumors Increases Distant Metastases in a Mouse Model. **Neoplasia**, v. 16, n. 11, p. 950–960, 2014.

MATSEN, C. B.; NEUMAYER, L. A. Breast cancer: A review for the general surgeon. **JAMA Surgery**, v. 148, n. 10, p. 971–979, 2013.

MCARTHUR, H. L.; PAGE, D. B. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Checkpoint Blockade, Cancer Vaccines, and Future Directions in Combination Immunotherapy. **Clinical Advances in Hematology & Oncology**, v. 14, n. 11, 2016.

MCDONALD, E. S. et al. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. **THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE**, v. 57, n. 2, 2016.

MCDUFFIE, M. Rose- Hulman Undergraduate Mathematics Journal A Hormone Therapy Model for Breast Cancer Using Linear Cancer Networks. v. 15, n. 1, 2014.

MISHRA, S. P. et al. Phyllodes Tumor of Breast: A Review Article. **ISRN Surgery**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

MISTRY, D. A. H.; FRENCH, P. W. Circulating phospholipids as biomarkers of breast cancer: A review. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 10, n. stage IV, p. 191–196, 2016.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, 2007.

MØRCH, L. S. et al. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 23, p. 2228–2239, 2017.

MORO, K. et al. Ceramide species are elevated in human breast cancer and are associated with less aggressiveness. **Oncotarget**, v. 9, n. 28, p. 19874–19890, 2018.

MUNIR, R. et al. Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. **British Journal of**

Cancer, v. 120, n. 12, p. 1090–1098, 2019.

MURUGAIYAN, G.; SAHA, B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. **The Journal of Immunology**, 2009.

NAGAHASHI, M. et al. High levels of sphingolipids in human breast cancer Masayuki. **journal of surgical research**, v. 204, n. 2, p. 435–444, 2016.

NAIR, M.; SANDHU, S.; SHARMA, A. Prognostic and Predictive Biomarkers in Cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 477–504, 2014.

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18–35, 2008.

NATARAJAN, R. et al. Increased 12-Lipoxygenase Expression in Breast Cancer Tissues and Cells. Regulation by Epidermal Growth Factor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 6, p. 1790–1798, 1997.

NICOLINI, A.; FERRARI, P.; DUFFY, M. J. Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, p. 56–73, 2018.

O'FLAHERTY, J. T. et al. Fatty Acid Metabolites in Rapidly Proliferating Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–8, 2013.

OGRETMEN, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 1, p. 33–50, 2017.

OSBORNE, G.; RUDEL, R.; SCHWARZMAN, M. Evaluating chemical effects on mammary gland development: A critical need in disease prevention. **Reproductive Toxicology**, 2015.

PANDYA, S.; MOORE, R. G. Breast Development and Anatomy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 54, n. 1, p. 91–95, 2011.

PAREJA, F. et al. Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants. **Npj Breast Cancer**, v. 2, p. 16036, 16 nov. 2016.

PATANI, N.; MARTIN, L. A.; DOWSETT, M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 1, p. 1–13, 2013.

PEREIRA, H. F. B. DO E. S. A.; VIAPIANA, P. DE S.; SILVA, K. L. T. Aspectos Clínicos e Patológicos do Câncer de Mama em Mulheres Jovens Atendidas na FCEcon entre 2003 e 2013. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 63, n. 2, p. 103–109, 2017.

PERROTTI, F. et al. Advances in lipidomics for cancer biomarkers discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

PICKENS, C. A. et al. Arachidonic acid-derived hydroxyeicosatetraenoic acids are positively associated with colon polyps in adult males: a cross-sectional study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

POLYAK, K. Breast cancer : origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007.

POORTMANS, P. M. P.; BOLLET, M.; LIMBERGEN, E. VAN. **Infiltrating lobular breast**

cancer: Truly a separate entity! Consequences for radiation therapy **Radiotherapy and Oncology**, 2013.

POWELL, W. S.; ROKACH, J. Biosynthesis, biological effects, and receptors of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and oxoeicosatetraenoic acids (oxo-ETEs) derived from arachidonic acid. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 340–355, 2015.

PUNTMANN, V. O. How-to guide on biomarkers: Biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 85, n. 1008, p. 538–545, 2009.

RAO, R. P. et al. Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. **Journal of Lipids**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

ROCHA, F. S. et al. Epidemiological profile of breast cancer in a reference hospital in the North Region. **Mastology**, v. 23, n. 3, p. 169–175, 2018.

ROJAS, K.; STUCKEY, A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 4, p. 651–672, 2016.

ROSTAS, J. W.; DYESS, D. L. Current Operative Management of Breast Cancer : An Age of Smaller Resections and Bigger Cures. v. 2012, 2012.

RYLAND, L. K. et al. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 138–149, 2011.

SALEMME, V. et al. The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. March, p. 1–20, 2021.

SCHNEBLE, E. et al. Breast Cancer Immunotherapy. **Maedica A Journal of Clinical Medicine Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 102, p. 185–191, 2015.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.

SCHROEDER, R. L.; STEVENS, C. L.; SRIDHAR, J. **Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer** **Molecules**, 2014.

SCHWEIGER, D.; FÜRSTENBERGER, G.; KRIEG, P. Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 3, p. 553–564, 2007.

SEDIĆ, M.; GRBČIĆ, P.; KRALJEVIĆ PAVELIĆ, S. Bioactive sphingolipids as biomarkers predictive of disease severity and treatment response in cancer: Current status and translational challenges. **Anticancer Research**, v. 39, n. 1, p. 41–56, 2019.

SHAH, R. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 283, 2014.

SHARMA ET AL. VARIOUS TYPES AND MANAGEMENT OF BREAST CANCER: AN OVERVIEW. **J. Adv. Pharm. Tech. Res.**, v. 1, n. 2, p. 109–126, 2010.

SHAWARBY, M.; AL-TAMIMI, D.; AHMED, A. Molecular classification of breast cancer: An overview with emphasis on ethnic variations and future perspectives. **Saudi Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 14, 2013.

SIMÕES, B. M. et al. The role of steroid hormones in breast cancer stem cells. [s.d.].

SINN, H. P.; KREIPE, H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th edition, focusing on issues and updates from the 3rd edition. **Breast Care**, v. 8, n. 2, p. 149–154, 2013.

SISSLER, J. et al. Follow-up after treatment for breast cancer. **Canadian family physician Médecin de famille canadien**, v. 62, p. 805–811, 2016.

SORGI, C. A. et al. Comprehensive high-resolution multiple-reaction monitoring mass spectrometry for targeted eicosanoid assays. **Scientific Data**, v. 5, p. 180167, 21 ago. 2018.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, v. 82, n. 3–4, p. 142–152, 2015.

STEINHILBER, D. et al. 5-lipoxygenase: Underappreciated role of a pro-inflammatory enzyme in tumorigenesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. DEC, n. December, p. 1–7, 2010.

STIBAN, J.; FISTERE, D.; COLOMBINI, M. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. **Apoptosis**, v. 11, n. 5, p. 773–780, 2006.

SU, X. et al. Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. **The Journal of Immunology**, 2010.

SUN, X. et al. CCL2-driven inflammation increases mammary gland stromal density and cancer susceptibility in a transgenic mouse model. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2017.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWANN, J. B.; SMYTH, M. J. Immune surveillance of tumors. v. 117, n. 5, 2007.

TAN, B. et al. **Identifying potential serum biomarkers of breast cancer through targeted free fatty acid profiles screening based on a GC–MS platform.** [s.l: s.n.]. v. 34

TANG, Y. et al. Classification, treatment strategy and associated drug resistance in breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, 2016.

TAO, Z. Q. et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p. 333–338, 2015.

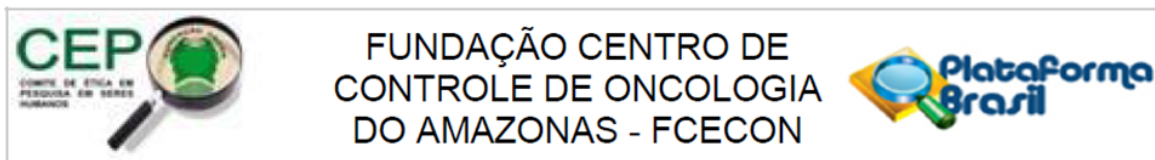
TEIXEIRA, LU. et al. Breast Cancer immunology. **oncology times**, 2016.

TOFT, D. J.; CRYNS, V. L. Minireview: Basal-Like Breast Cancer: From Molecular Profiles to Targeted Therapies. [s.d.].

TUNG, N. et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. **Cancer**, 2015.

WAHID, B. An Update on Breast Cancer Biomarkers. **MOJ Immunology**, v. 5, n. 2, 2017.

- WAKS, A. G.; WINER, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019.
- WANG, D.; DUBOIS, R. N.; RICHMOND, A. NIH Public Access. v. 9, n. 6, p. 688–696, 2010.
- WANG, L. Early diagnosis of breast cancer. **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 7, 2017.
- WANG, M. et al. Novel Advances in Shotgun Lipidomics for Biology and Medicine. **Prog Lipid Res**, v. 61, p. 83–108, 2016.
- WANG, M. T.; HONN, K. V.; NIE, D. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 26, n. 3–4, p. 525–534, 2007.
- WANG, W. et al. The Lipid Metabolic Landscape of Cancers and New Therapeutic Perspectives. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. December, p. 1–15, 2020.
- WATKINS, G. et al. Expression of thromboxane synthase, TBXAS1 and the thromboxane A2 receptor, TBXA2R, in human breast cancer. **International Seminars in Surgical Oncology**, v. 2, p. 1–8, 2005.
- WEI, S. et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 7, p. 297–307, 2013.
- WELTE, T.; ZHANG, X. H. F. **Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease** *Mediators of Inflammation*, 2015.
- YERSAL, O.; BARUTCA, S. Ozlem Yersal, Sabri Barutca. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 3, 2014.
- YILMAZ ET AL. Characteristics of Special Type Breast Tumors in Our Center. **European Journal of Breast Health**, v. 14, n. 1, p. 17–22, 2018.
- YU, L. Y. et al. New immunotherapy strategies in breast cancer. **Chinese Pharmacological Bulletin**, v. 32, n. 8, p. 1037–1040, 2016.
- YUHKI, K. I. et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 129, n. 2, p. 195–205, 2011.
- ZHANG, Y.-J. et al. Status quo and development trend of breast biopsy technology. **Gland surgery**, v. 2, n. 1, p. 15–24, 2013.
- ZHAO, Y. Y. et al. Lipidomics: Novel insight into the biochemical mechanism of lipid metabolism and dysregulation-associated disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 220–238, 2015.
- ZHAO, Y.; YANG, C.; HASLAM, S. Z. Breast Cancer Agents : Treatment & Prevention. v. 2, p. 1–5, 2014.
- ZHENG, K. et al. Sphingomyelin synthase 2 promotes an aggressive breast cancer phenotype by disrupting the homeostasis of ceramide and sphingomyelin. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 3, 2019.

ANEXO A – PARECER DO CEP/FCECON**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: LIPIDOMA DE MEMBRANA DE TUMORES MAMÁRIOS E IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES LIPÍDICOS CARCINOGENICOS: CORRELAÇÃO COM PRODUÇÃO DE IL-17 COMO FATOR INFLAMATÓRIO

Pesquisador: Rayanne da Silva Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15099719.2.0000.0004

Instituição Proponente: Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado Amazonas - FCECON

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.456.136

Situação do Parecer:

Aprovado

MANAUS, 16 de Julho de 2019

Assinado por:
VALQUIRIA DO CARMO ALVES MARTINS
(Coordenador(a))

APÊNDICE A – TCLE do Grupo Câncer

Convidamos a senhora para participar do projeto de pesquisa **“Lipidoma de membrana de tumores mamários e identificação de biomarcadores lipídicos carcinogênicos: correlação com produção de IL-17 como fator inflamatório**, o qual pretende identificar moléculas que poderão auxiliar no prognóstico, tratamento e monitoramento pós-cirúrgico do câncer de mama. Este projeto está sob a responsabilidade dos pesquisadores Rayanne da Silva Souza, Dra. Kátia Luz Torres Silva e Dr. Carlos Artério Sorgi.

Se a Senhora aceitar participar, estará contribuindo para aumentar o conhecimento científico sobre o câncer de mama, estará contribuindo para nos ajudar a descobrir novos biomarcadores que poderão auxiliar no prognóstico, tratamento e monitoramento pós-cirúrgico e entender novos mecanismos da doença. Além disso, a sua contribuição poderá futuramente ajudar muitas outras mulheres a descobrirem a doença mais cedo.

Sua participação é voluntária e se dará inicialmente após a consulta em que for indicada a realização de cirurgia. A Senhora será entrevistada e responderá a um questionário e será feita a medição da sua altura e peso. Além disso, alguns dos seus dados serão retirados do seu prontuário. No dia que a Senhora vier fazer os exames de sangue para poder marcar a cirurgia, serão colhidos mais dois tubos de sangue para o projeto. Além disso, sua participação também se dará com a coleta de amostras do tumor que será retirado durante a cirurgia e com a coleta de uma pequena amostra do tecido normal, não lhe causando prejuízos, pois iremos retirar apenas uma parte do tumor antes dele ser descartado. Um ano após a cirurgia ou após o tratamento quimioterápico, quando a Senhora voltar para acompanhamento médico, será feita uma nova coleta de sangue.

Alguns riscos poderão ocorrer decorrentes de sua participação na pesquisa. Durante a entrevista e medição de peso e altura, a Senhora pode sentir algum desconforto, constrangimento ou algum transtorno emocional. Caso a Senhora sinta algo desta natureza poderá solicitar que paremos a aplicação do questionário ou poderemos também encaminhá-la para o serviço psicológico da FCECON. Durante a coleta de sangue pode haver o risco de dor ou incômodo e evitaremos ao máximo este desconforto. Outro risco é a quebra de sigilo de suas informações de forma não intencional por perda ou roubo. Mas para evitar esse risco, todos os seus dados e materiais coletados serão identificados por um código único que apenas os pesquisadores terão conhecimento para garantir sua privacidade.

Se depois de consentir em sua participação a Senhora desistir de continuar participando do seguimento desse estudo tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa, nem do seu tratamento ou atendimento no serviço de saúde. A Senhora não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. No entanto, os pesquisadores serão responsáveis pelas despesas que de alguma forma forem atribuídas especificamente à execução do estudo. Além disso, a Senhora terá direito de pedir indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Os materiais coletados serão utilizados unicamente para os objetivos desta pesquisa. Uma parte será analisada na FCECON e outra será encaminhada para a Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (USP/RP) para as análises. Todos os dados serão mantidos em sigilo até o término deste estudo. Os resultados serão analisados e publicados

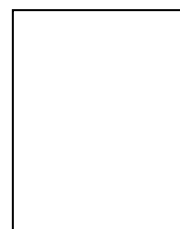
em artigos científicos, mas sua identidade não será divulgada e será preservada a sua privacidade.

Para qualquer outra informação, a Senhora poderá entrar em contato com a Pesquisadora Responsável Rayanne Souza ou com a Profa. Dra. Kátia Torres no endereço Rua Francisco Orellana, 215 – Planalto – Diretoria de Ensino e Pesquisa, pelo telefone (92) 3655-4703 ou (92) 98128-0722. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é formado por profissionais de diferentes áreas, que revisam os estudos que envolvem seres humanos, para garantir os direitos e a segurança de todos os participantes da pesquisa. A Senhora também pode ligar para o CEP que aprovou a realização deste estudo nesta Instituição, através do telefone (92) 3655-4774.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informada sobre o que os pesquisadores pretendem realizar e porque precisam da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Manaus, ____/____/____



Assinatura da participante

Impressão do dedo polegar
(caso não saiba assinar)

Assinatura da Pesquisadora responsável
Rayanne da Silva Souza
rss.farmacia@gmail.com
(92) 98128-0722

Assinatura da Pesquisadora Colaboradora
Bruna Dutra Guimarães

APÊNDICE B –TCLE do Grupo Controle

Convidamos a senhora para participar do projeto de pesquisa **“Lipidoma de membrana de tumores mamários e identificação de biomarcadores lipídicos carcinogênicos: correlação com produção de IL-17 como fator inflamatório**, o qual pretende identificar moléculas que poderão auxiliar no prognóstico, tratamento e monitoramento pós-cirúrgico do câncer de mama. Este projeto está sob a responsabilidade dos pesquisadores Rayanne da Silva Souza, Dra. Kátia Luz Torres Silva e Dr. Carlos Artério Sorgi.

Se a Senhora aceitar participar, estará contribuindo para aumentar o conhecimento científico sobre o câncer de mama, estará contribuindo para nos ajudar a descobrir novos biomarcadores que poderão auxiliar no prognóstico, tratamento e monitoramento pós-cirúrgico e entender novos mecanismos da doença. Além disso, a sua contribuição poderá futuramente ajudar muitas outras mulheres a descobrirem a doença mais cedo.

Sua participação é voluntária e se dará inicialmente antes da realização de sua cirurgia. A Senhora será entrevistada, responderá a um questionário e será feita a medição da sua altura e peso. No dia da sua cirurgia será feita uma coleta de sangue e também será coletado um fragmento do tecido que será retirado na sua cirurgia e que posteriormente será descartado. A Senhora fará parte do grupo controle, ou seja, o grupo de pacientes saudáveis sem diagnóstico de câncer de mama. As suas amostras coletadas servirão de parâmetro para comparar com as amostras de pacientes com câncer de mama, a fim de identificar as diferenças entre os dois grupos.

Alguns riscos poderão ocorrer decorrentes de sua participação na pesquisa. Durante a coleta de sangue pode haver o risco de dor ou incômodo e evitaremos ao máximo este desconforto. Outro risco é a quebra de sigilo de suas informações de forma não intencional por perda ou roubo. Mas para evitar esse risco, todos os seus dados e materiais coletados serão identificados por um código único que apenas os pesquisadores terão conhecimento para garantir sua privacidade.

Se depois de consentir a sua participação a Senhora desistir de continuar participando do seguimento desse estudo, a Senhora tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa, nem do seu procedimento cirúrgico. A Senhora não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. No entanto, os pesquisadores serão responsáveis pelas despesas que de alguma forma forem atribuídas especificamente à execução do estudo. Além disso, a Senhora terá direito de pedir indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Os materiais coletados serão utilizados unicamente para os objetivos desta pesquisa. Uma parte será analisada na FCECON e outra será encaminhada para a Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (USP/RP) para as análises. Todos os dados serão mantidos em sigilo até o término deste estudo. Os resultados serão analisados e publicados em artigos científicos, mas sua identidade não será divulgada e será preservada a sua privacidade.

Para qualquer outra informação, a Senhora poderá entrar em contato com a Pesquisadora Responsável Rayanne Souza ou com a Profa. Dra. Kátia Torres no endereço Rua Francisco Orellana, 215 – Planalto – Diretoria de Ensino e Pesquisa, pelo telefone (92) 3655-4703 ou (92) 98128-0722. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é formado por

profissionais de diferentes áreas, que revisam os estudos que envolvem seres humanos, para garantir os direitos e a segurança de todos os participantes da pesquisa. A Senhora também pode ligar para o CEP que aprovou a realização deste estudo nesta Instituição, através do telefone (92) 3655-4774.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informada sobre o que os pesquisadores pretendem realizar e porque precisam da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Manaus, ____/____/____

Assinatura da participante
dedo polegar



Impressão do

(caso não saiba assinar)

Assinatura do pesquisador responsável

Rayanne da Silva Souza

rss.farmacia@gmail.com

(92) 98128-0722

APÊNDICE C – FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO

Número do Prontuário/ Número de identificação no projeto: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade:

Local de residência nos últimos dois anos (procedência/cidade)

Endereço: _____

Telefone: _____

Telefone de conhecido: _____

Data da entrevista: ____/____/____ Data da cirurgia: ____/____/____

DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

Cor autodeclarada: branca () preta/negra () parda () amarela () indígena ()

Escolaridade: Nenhum () Não sabe ()
Fundamental incompleto () completo ()
Médio incompleto () completo ()
Superior incompleto () completo ()

Renda: nenhuma () até 1 salário mínimo () de 1 a 3 salários mínimos ()
mais de 3 salários mínimos ()

Estado civil: solteira () casada () união estável () divorciada () viúva ()

FATORES DE RISCO

1) **Já teve câncer de mama?**

Sim () Não ()

2) **Já teve algum outro tipo de câncer? Câncer de ovário?**

Sim () Não ()

Se sim, qual? _____

3) **Alguém da família já teve câncer?**

Sim () Não ()

Se sim, qual tipo: _____

4) **Tem filhos?** Sim () Não ()

5) **Quantas gestações?**

6) **Quantos abortos?**

7) **Amamentou?**

Sim () Não ()

8) **Com quantos anos foi a primeira menstruação?** _____

9) **Ainda menstrua?**

Sim () Não ()

Se não, há quanto tempo? _____

10) **Já fez ou faz uso de hormônio (anticoncepcional ou reposição hormonal)?**

Não () anticoncepcional oral () anticoncepcional injetável ()

reposição hormonal ()

Se sim, por quanto tempo? _____

CLÍNICA

11) **Data do exame histopatológico:** _____

12) **Tipo Histológico:** _____

13) **Painel Imunohistoquímico:** _____

14) **Estadiamento Clínico:** _____

15) **Tipo de Quimioterapia:** _____

Hábitos de Vida**16) Pratica exercícios físicos?**

Nunca () às vezes () quase sempre () sempre ()

17) Consome bebida alcoólica?

Nunca () às vezes () quase sempre () sempre ()

18) Já consumiu bebida alcoólica antes? Por quanto tempo?

Sim () Tempo: _____ Não ()

19) Faz uso de cigarro?

Nunca () às vezes () quase sempre () sempre ()

20) Já fumou antes? Por quanto tempo?

Sim () Tempo: _____ Não ()

21) Como você considera seus hábitos alimentares

Ótimo () Bom () Razoável () Péssimo ()

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Peso: _____

Altura: _____

IMC: _____

APÊNDICE D – Espécies lipídicas identificadas por LC/MS-MS

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Fragmento (m/z)	Tempo de retenção
PGE2	351	189.1301 - 189.1341	4.77
TXB2	369	169.0908 - 169.0938	3.82
5-HETE	319	115.0315 - 115.0355	13.94
12-HETE	319	179.1081 - 179.1153	13.82
8-HETE	319	155.0720 - 155.0780	13.81
11-HETE	319	167.1096 - 167.1146	13.70
12-oxo-EETE	317	203.1775 - 203.1815	14.28
15-oxo-EETE	317	113.0989 - 113.1029	13.64
15-HETE	319	175.1461 - 175.1901	13.51
Sphingosina-1-P C18:0	380,2	264.2655 - 264.2695	3.67
C16:0-Ceramida	538,5	264.2652-264.26710	4.65
C18:0-Ceramida	566,5	264.2652-264.26704	4.89
C24:1-Ceramida	648,6	264.2652-264.26802	5.14
C24:0-Ceramida	650,6	264.2652-264.26702	4.90
C25:0-Ceramida	664,4	264.2652-264.26702	5.14
C16_Glc_Ceramide (HexCer)	700,5	264.2652-264.26702	5.39
C24:1_Glc_Ceramide (HexCer)	810,6	264.2652-264.26702	7.34
SM_18:0	731,6	184.0703-184.0753	6.37
SM_24:0	815,7	184.0703-184.0753	6.83
Cer1P (16:0)	618,4	264.2652-264.26702	8.32
Sphingosina C18:0	300,3	282.2480-282.2530	5.40
Sphingosina C14:0	244,2	226.1765 - 226.1815	2.73
Sphinganine C18:0	302,2	284.2912-284.2952	3.22
Sphinganine C16:0	274,2	256.2612 - 256.2652	2.73
C20:1 Sph	328,3	310.3000-310.3040	3.71
C18:1 Cer	464,4	264.2694-264.2714	5.42
C20 Cer	594,6	264.2671-264.2701	5.18
C22 Cer	622,7	264,2	5.18
C26:1 Cer	676,8	264,2	5.43
C14_SM	675,5	183.9758-184.0758	6.17
C16:1_SM	701,600	183.9758-184.0758	6.17
C16_SM	703,57	183.9758-184.0758	6.27
C18:1_SM	729,6	183.9758-184.0758	6.66
C20:1_SM	757,6	183.9758-184.0758	6.17
C20_SM	759,6	183.9758-184.0758	6.91
C22:1_SM	785,591	183.9758-184.0758	6.91
C22_SM	787,6	183.9758-184.0758	7.40
C23:1_SM	799,6	183.9758-184.0758	8.13
C23_SM	801,6	183.9758-184.0758	9.35
C24:1_SM	813,7	183.9758-184.0758	8.62
C25:1_SM	827,7	183.9758-184.0758	5.94
C25_SM	829,7	183.9758-184.0758	10.57
C26:1_SM	841,7	183.9758-184.0758	10.33

Continuação apêndice D

Analito	Íon Precursor (m/z)	Íon Fragmento (m/z)	Tempo de retenção
C22:1_HexCer	782,7	264.2652-264.26705	7.17
C22_HexCer	784,66	264.2652-264.26706	7.17
C24_HexCer	812,7	264.2652-264.26710	7.91
C16_HexCer_OH	716,7	264.2652-264.26716	5.73
C23:1_HexCer_OH	812,7	264.2652-264.26721	5.25
LacCER(d18:0/24:1)	974,7502	264.2687-264.2727	5.02
LacCER(d18:1/22:0)	946,7189	264.2687-264.2734	4.55
LacCER(d18:0/26:0)	1004,7972	264.2687-264.2737	5.17
LacCER(d18:0/16:0)	864,6407	264.2687-264.2739	5,77
LacCER(d18:1/24:0)	974,7502	264.2687-264.2745	5.05
dHCer(d18:0/16:0)	540,535	284.3	4.81
dHCer(d18:0/18:0)	568,563	284.2943-284.2983	6.52
dHCer(d18:0/20:0)	596,5976	284.2943-284.2983	7.01
dHCer(d18:0/22:0)	624,6289	284.2943-284.2983	7.50
dHCer(d18:0/24:1(15Z))	650,6446	284.2943-284.2983	7.50
dHCer(d18:0/24:0)	652,6602	284.2943-284.2983	8.47
dHCer(d20:0/16:0)	568,3566	284.2943-284.2983	6.79
dHCer(d20:0/18:0)	596,5976	284.2943-284.2983	6.79
dHCer(d20:0/20:0)	624,6289	284.2943-284.2984	7.52
dHCer(d20:0/22:0)	652,6602	284.2943-284.2985	8.25