



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PÂMELLA APARECIDA FERREIRA FAGOTTI

**METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO COMO MARCADORES
DE PIOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA EM
MULHERES COM EXCESSO DE PESO CORPÓREO**

Londrina
2019

PÂMELLA APARECIDA FERREIRA FAGOTTI

**METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO COMO MARCADORES
DE PIOR PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA EM
MULHERES COM EXCESSO DE PESO CORPÓREO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Carolina Panis

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F156m Fagotti, Pâmella Aparecida Ferreira.
Metabólitos do óxido nítrico como marcadores de pior prognóstico no câncer de mama em mulheres com excesso de peso corpóreo / Pâmella Aparecida Ferreira Fagotti. - Londrina, 2019.
69 f. : il.

Orientador: Carolina Panis.
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Fisiopatologia - Tese. 2. Mamas - Câncer - Tese. 3. Obesidade nas mulheres - Tese. 4. Óxido nítrico - Tese. I. Panis, Carolina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616-092

PÂMELLA APARECIDA FERREIRA FAGOTTI

**METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO COMO MARCADORES DE PIOR
PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA EM MULHERES COM
EXCESSO DE PESO CORPÓREO**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE

Prof^a. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Vanessa Jacob Victorino
Instituto Federal do Rio de Janeiro *campus*
Engenheiro Paulo de Frontin - IFRJ

Londrina, 28 de novembro de 2019.

Dedico este trabalho a Deus por me conduzir, me capacitar e me fortalecer todos os dias para nunca desistir e sempre lutar pelo o meu sucesso profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Carolina Panis, pela oportunidade confiada na qual me orientou com muita paciência e carinho, e também por sua disponibilidade em todos os momentos, seus estímulos, otimismo e conselhos se tornando mais que uma orientadora mas sobretudo uma amiga.

Aos acadêmicos da Liga de Oncologia da Unioeste pela realização das coletas, em especial aos alunos Bruno Vinícius Campestrini e Vitor Maito que auxiliaram nas dosagens das amostras.

À minha equipe de trabalho, Lucia, Thaila, Thalita e Ana Glauca, que por muitas vezes me cobriram no trabalho, me dando o suporte necessário para que eu pudesse comparecer as aulas e as reuniões com a minha orientadora para que esse sonho pudesse ser alcançado.

Ao Dr. Alexandre Queiroz, meu chefe, que me apoiou e permitiu que esse projeto se concretizasse.

Aos meus avós e a minha mãe que me incentivaram a todo o momento em minha formação pessoal e profissional.

Aos meus amigos e todas as pessoas que torceram por mim para que eu alcançasse este objetivo tão almejado.

FAGOTTI, P. A. F. **Metabólitos do óxido nítrico como marcadores de pior prognóstico no câncer de mama em mulheres com excesso de peso corpóreo.** 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é uma doença multifatorial e heterogênea, que pode ser clinicamente dividida em subtipos que, juntamente com fatores de risco da doença, determinam o seu prognóstico. Os fatores determinantes da agressividade tumoral, bem como sua relação com as características clínicas da doença ainda são pouco conhecidos. **Objetivos:** Avaliar os níveis circulantes de nitrito como estimativa de óxido nítrico (NO[•]), um importante mediador da resposta inflamatória crônica, e sua correlação com os fatores determinantes da agressividade da doença. **Materiais e métodos:** Este estudo incluiu 61 mulheres com câncer ductal infiltrante (CDI), submetidas a cirurgia de diagnóstico no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê Nacional pela Ética na Pesquisa, sob número CAAE 35524814.4.0000.0107. A estimativa dos níveis de NO[•] foi realizada em amostras de plasma das pacientes pelo método cádmio-cobre revelado com reagente de Griess. Os resultados foram analisados através do software GraphPadPrism 7.0 e SPSS 25.0.0 utilizando-se análises de variância ANOVA, teste t de Student e teste de Mann-Whitney considerando-se $p \leq 0,05$ como significativo. **Resultados:** Os níveis circulantes de NO[•] nas pacientes tiveram média e desvio padrão de $51,2 \pm 2,1 \mu\text{M}$. Observou-se diferença significativa nos níveis de NO[•] nas pacientes com subtipo Luminal B e com excesso de peso ($67,3 \pm 10 \mu\text{M}$, $p=0,035$) em relação aquelas eutróficas ($29,1 \pm 7,7 \mu\text{M}$). Sobre os fatores de risco da doença, houve diferença significativa entre: sobrepeso ($57,2 \pm 4,4 \mu\text{M}$) e eutróficas ($41,9 \pm 4,9 \mu\text{M}$), com $p=0,05$; pós-menopausa eutróficas ($39,4 \pm 4,9 \mu\text{M}$) e pós-menopausa com excesso de peso ($57,1 \pm 5,4 \mu\text{M}$) com $p=0,05$; tamanho do tumor entre 2 a 5 cm em eutróficas ($38,1 \pm 4,2 \mu\text{M}$) e naquelas com excesso de peso ($54,7 \pm 4,6 \mu\text{M}$, $p=0,05$). **Conclusão:** Os dados obtidos permitem concluir que há uma diferença na concentração de NO[•] plasmático e que a mesma se correlaciona com certos subtipos moleculares e fatores de risco das pacientes, relacionados ao mau prognóstico da doença.

Palavras-chave: Câncer de mama. Óxido nítrico. Excesso de peso.

FAGOTTI, P. A. F. **Nitric oxide metabolites as markers of worse prognosis in breast cancer in overweight women.** 2019. 70 p. Dissertation (Master in Clinical and Laboratory Physiopathology) – State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is a multifactorial and heterogeneous disease that can be clinically divided into subtypes that, together with risk factors for the disease, determine its prognosis. The determinants of tumor aggressiveness as well as its relationship with the clinical characteristics of the disease are still poorly understood.

Objectives: Circulating nitrite levels were evaluated as an estimate of nitric oxide (NO[•]), an important mediator of chronic inflammatory response, and its correlation with factors determining disease aggressiveness.

Materials and methods: This study included 61 women with infiltrating ductal cancer (ICD) who underwent diagnostic surgery at the Francisco Beltrão Cancer Hospital. It was approved by the National Committee for Research Ethics, under number CAAE 35524814.4.0000.0107. Nitrite levels as NO[•] estimates were performed on patients' plasma samples by the cadmium-copper method revealed with Griess reagent. The results were analyzed using GraphPadPrism 7.0 and SPSS 25.0.0 software using analysis of variance ANOVA, Student t test and Mann-Whitney test considering $p \leq 0.05$ as significant. **Results:** Circulating NO[•] levels in the patients averaged $51.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$. Significant difference was observed in NO[•] levels in patients with Luminal B subtype and overweight ($67.3 \pm 10 \mu\text{M}$, $p = 0.035$) compared to those with normal weight ($29.1 \pm 7.7 \mu\text{M}$). Regarding disease risk factors, there was a significant difference between: overweight ($57.2 \pm 4.4 \mu\text{M}$) and eutrophic ($41.9 \pm 4.9 \mu\text{M}$), with $p = 0.05$; eutrophic postmenopausal women ($39.4 \pm 4.9 \mu\text{M}$) and overweight postmenopausal women ($57.1 \pm 5.4 \mu\text{M}$) with $p = 0.05$; tumor size between 2 and 5 cm in eutrophic ($38.1 \pm 4.2 \mu\text{M}$) and in overweight ($54.7 \pm 4.6 \mu\text{M}$, $p = 0.05$).

Conclusion: The data obtained allow us to conclude that there is a difference in plasma NO[•] concentration and that it correlates with certain molecular subtypes and patient risk factors related to the poor prognosis of the disease.

Key words: Breast Cancer. Nitric Oxide. Overweight.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo	14
Figura 2 – Efeitos biológicos diretos e indiretos do óxido nítrico	24
Figura 3 – Alterações bioquímicas no estresse nitrosativo	25

ARTIGO

Figure 1 – <i>Study design</i>	40
Figure 2 – Comparative analysis of plasmatic estimated NO[•] levels in eutrophic and overweighed patients. Data represents the mean ± standard error of the mean. * Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test	46
Figure 3 – Molecular subtypes of tumors and the estimative of plasmatic NO[•] in breast cancer women categorized according to their BMI. A – Patients bearing Luminal A tumors, B – patients bearing Luminal B tumors, C – patients bearing HER2-amplified tumors and D – patients bearing triple negative tumors. Data represent the mean ± standard error of the mean. * Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test	47
Figure 4 – Menopausal status and estimated NO[•] levels in eutrophic and overweighed breast cancer patients. Data represent the mean ± standard error of the mean. * Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test	48
Figure 5 – Tumor size and estimated NO levels in eutrophic and overweight women with breast cancer. Data represents the mean ± standard error of the mean. * Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama	20
--	----

ARTIGO

Table 1 – <i>Clinicopathological data of the patients included in the study</i>	44
Table 2 – <i>Estimated NO⁺ levels according to patients' age at diagnosis, intratumoral emboli, histological grade and lymphnodal invasion</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
BRCA1	Gene Breast Cancer 1
BRCA2	Gene Breast Cancer 2
C	Celsius
CDI	Carcinoma ductal infiltrante mamário
Ceonc	Hospital de Câncer de Francisco Beltrão-PR
CHECK 2	Checkpoint quinase 2
Cm	Centímetros
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CuSO ₄	Sulfato cúprico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Receptor de estrogênio
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERNO	Espécie reativa de nitrogênio e oxigênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERs	Espécies reativas
Ets-1	Gene que codifica a proteína C-ets-1
g	Grama
g/L	Grama por litro
HER-2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
HIF-1a	Hipóxia 1 alfa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina-6

IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto nacional do câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Ki-67	Fração proliferativa
LMB	Lesões mamárias benignas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mM	Milimolar
mmol/L	Milimolar por litro
MnSOD	Manganês superóxido dismutase
NADPH	Agente redutor de fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nM	Nanomolar
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO•	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Dióxido de nitrogênio
N ₂ O ₃	Trióxido de dinitrogênio
N ₂ O ₄	Tetróxido de dinitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS1	Gene óxido nítrico sintase-1
NOS2	Gene óxido nítrico sintase-2
NOS3	Gene óxido nítrico sintase-3
•ONOO ⁻	Peroxinitrito
•O ₂ ⁻	Ânion superóxido
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PR	Receptor de progesterona
rpm	Rotação por minuto
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TNM	Tumor, nódulo e metástase
TP53	Gene que produz a proteína do tumor p53

μL	Microlitro
μM	Micromolar
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZnSO_4	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	14
2.2	FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE MAMA	15
2.3	FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	17
2.4	CÂNCER DE MAMA E INFLAMAÇÃO	21
2.5	BIOQUÍMICA DO NO•	23
2.6	FISIOPATOLOGIA DO EIXO NO• EM CÂNCER DE MAMA	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	DESENHO DO ESTUDO	30
4.2	SUBTIPAGEM MOLECULAR POR IMUNOHISTOQUÍMICA	31
4.3	ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO•)	32
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
	CIRCULATING NITRIC OXIDE PRODUCTS AS PROGNOSTIC MARKERS IN OVERWEIGHT WOMEN WITH BREAST CANCER	34
1	INTRODUCTION	36
2	MATERIALS AND METHODS	38
2.1	STUDY DESIGN	38
2.2	MOLECULAR SUBTYPING BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY.....	40
2.3	MEASUREMENT OF NITRIC OXIDE (NO•) LEVELS	41
2.4	STATISTICAL ANALYSIS	41
3	RESULTS	43
4	DISCUSSION	49
5	CONCLUSION.....	52

REFERENCES	54
REFERÊNCIAS	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
ANEXOS	61

1 1 INTRODUÇÃO

2 O câncer de mama é um problema de saúde pública mundial e
3 atualmente é a neoplasia que mais mata mulheres no mundo todo (INCA, 2019). O
4 carcinoma ductal infiltrante é tipo de câncer que se inicia no ducto mamário, sendo
5 considerado o tipo mais comum com cerca de 70% dos casos (ONCOGUIA, 2017).
6 Apesar de nos últimos anos a pesquisa ter avançado muito no conhecimento desta
7 doença, ainda há muitas dúvidas e questionamentos a respeito.

8 Sabe-se que o câncer de mama é uma neoplasia agressiva, e que
9 diversos fatores têm sido relatados como potenciais fomentadores deste processo,
10 incluindo a inflamação crônica (INUMARU, L.; SILVEIRA, E. A. DA; NAVES, M. M.
11 V., 2011). Durante a inflamação ocorre a produção de mediadores, como os radicais
12 livres, que são capazes de gerar o câncer e também de promover sua progressão
13 (ONUHCIC, A. C.; CHAMMAS, R., 2010).

14 Os radicais livres são um grupo de espécies reativas potentes,
15 capazes de alterar a conformação de moléculas biológicas e afetar seu
16 funcionamento. A superprodução de tais espécies durante a resposta inflamatória
17 resulta em um desequilíbrio entre a geração de pró-oxidantes e sua neutralização,
18 dando origem a uma condição chamada estresse oxidativo (KHANNA et al., 2014).

19 Neste contexto, ocorre a produção do óxido nítrico (NO^{\bullet}), uma
20 espécie reativa de nitrogênio que possui dupla função. Em níveis baixos, o NO^{\bullet} pode
21 ter efeitos diretos atuando na regulação de processos fisiológicos como
22 vasodilatação, aprendizado, envolvimento na memória cognitiva e apoptose.
23 Entretanto, em níveis aumentados, pode ter efeitos indiretos atuando na
24 fisiopatologia da resposta inflamatória, ao ser convertido na molécula de peroxinitrito
25 (ONOO^{\bullet}) que é uma das espécies reativas responsáveis pelo estresse nitrosativo. A
26 produção de NO^{\bullet} na inflamação é apontada como um mecanismo que
27 majoritariamente, favorece a progressão dos tumores (WINK et al., 1998).

28 No entanto, muito se sabe sobre a relação de NO^{\bullet} com o câncer de
29 mama (BROWN, N. S.; BICKNELL, R., 2001) mas nada relacionado a inflamação
30 crônica decorrente do aumento do índice de massa corporal, especialmente quando
31 correlacionados aos parâmetros clinicopatológicos determinantes do prognóstico
32 desta patologia, como subtipo molecular, tamanho, nódulo e metástase. Sabendo-
33 se que o excesso de gordura corporal se destaca como um dos fatores que

1 desregula o processo inflamatório (STORLARCZYK, 2017) e são considerados
2 como o maior local de metabolização do estrogênio especialmente em mulheres
3 com excesso de gordura corporal ou alto índice de massa corporal (INUMARU, L. E.;
4 SILVEIRA, E. A. DA; M.M.V., 2011), se faz necessário maiores estudos a respeito.

5 Estudos iniciais do nosso grupo sugerem que os níveis de NO[•]
6 podem variar conforme algumas características das pacientes e ser modificados
7 pelo tratamento (PANIS et al., 2012). Assim, faz-se necessário um aprofundamento
8 para entender sua relação com as características clinicopatológicas relevantes para
9 o entendimento da progressão da doença.

10 Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os níveis plasmáticos
11 de nitrito como estimativa de NO[•] em pacientes portadoras de carcinoma ductal
12 infiltrante da mama e correlacioná-los com achados clínicos como idade ao
13 diagnóstico, tamanho do tumor, grau histológico, padrão de receptores expressos e
14 subtipo molecular, invasão linfonodal, presença de êmbolos angiovasculares,
15 estadiamento clínico tamanho, nódulo e metástase, status menopausal e o índice de
16 massa corporal.

17

18

19

20

1 2 REVISÃO DE LITERATURA

2

3 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

4


5 O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial que se
6 desenvolve através da multiplicação desordenada, crescimento anormal das células
7 mamárias, tanto nos ductos mamários quanto nos lóbulos mamários (INCA, 2019).

8

9 Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, o câncer de
10 mama é o tipo de neoplasia maligna mais comum entre as mulheres no Brasil,
11 correspondendo a cerca de 29% dos novos casos a cada ano. Estima-se 59.700
12 novos casos para o ano de 2018-2019, sendo o câncer de mama responsável por
13 15.403 mortes de mulheres em 2015.

14 As estimativas de incidência do câncer de mama nos mostram que é
15 o primeiro mais frequente nas mulheres das regiões sul tendo um risco estimado de
16 73,07 casos a cada 100 mil mulheres, sendo 11.030 novos casos por estado (Figura
17 1). No estado do Paraná estimou-se para o ano de 2018 cerca de 3.730 casos por
18 100 mil habitantes (INCA, 2019).

18

	Localização primária	Casos	%
Mulheres 	Mama Feminina	11.030	28,7%
	Cólon e Reto	3.460	9,0%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	3.110	8,1%
	Colo do Útero	2.130	5,5%
	Estômago	1.350	3,5%
	Sistema Nervoso Central	1.290	3,4%
	Ovário	1.080	2,8%
	Corpo do Útero	1.070	2,8%
	Leucemias	980	2,5%
	Pele Melanoma	960	2,5%

19

20 **Figura 1** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados
21 para 2018 por sexo.

22

Fonte: INCA, 2019

23

24

2.2 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama possui alguns fatores de risco, podendo ser descritos como fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos estão relacionados à predisposição genética, sendo responsável por 5 a 10% de todos os casos de carcinoma de mama, tendo como característica o acometimento de mulheres jovens, e dependente da constituição hormonal. Já os fatores extrínsecos são constituídos pelo ambiente, agentes físicos, químicos e biológicos capazes de causar danos ao genoma, os quais são influenciados pelo estilo de vida, ou seja, excesso de peso corporal, falta de atividade física, consumo de bebidas alcoólicas, vida reprodutiva ou outros fatores que possam favorecer o desenvolvimento do câncer de mama (VIEIRA, 2005).

Os cânceres de mama hereditários geralmente surgem a partir de uma mutação genética onde um gene, que é responsável por reparo nas moléculas de DNA alteradas ou indução de apoptose celular, perde sua função, deixando o indivíduo predisposto a tumores malignos, devido às constantes agressões que o DNA celular sofre a todo o momento. Nos dias atuais, há o conhecimento de alguns desses genes que estão ligados diretamente a predisposição de várias neoplasias entre elas o câncer de mama, como por exemplo: Gene breast cancer 1 (BRCA 1), Gene breast cancer 2 (BRCA 2), Gene que produz a proteína do tumor p53 (TP53), Checkpoint quinase 2 (CHECK 2) entre outros que ainda estão em estudos (CARDOSO, M.; FAGANELLO, T. R. DE C.; FRIZZO, M. N., 2015).

Entre os fatores de risco biológicos associado ao câncer de mama, a menarca é um deles. Quanto mais precoce o início dos ciclos menstruais nas mulheres maior é a sua exposição ao meio hormonal, o que é considerado um fator etiológico importante. Ainda existe a relação da menarca precoce com o aumento do nível de estrogênio produzido por toda a vida reprodutiva. Assim, também acontece com a menopausa, que maior é o risco de câncer de mama quando a mulher entra mais tarde no período de menopausa, sendo de aproximadamente 17% para cada diferença de 5 anos na idade da menopausa (KELSEY, J. L.; GAMMON, M. D.; JOHN, E. M., 1993).

Esta relação da menarca e menopausa está associada com a longa duração da atividade ovariana no qual o organismo feminino estará por mais tempo em contato com o estrogênio, sendo o hormônio mais biologicamente ativo no tecido

1 mamário, que tem sido estudado devido aos seus efeitos significativos no
2 crescimento do epitélio mamário, visto que, o câncer está associado diretamente
3 com a divisão celular e qualquer fator que aumente a atividade mitótica no epitélio
4 mamário aumentará este risco (APTER, D.; REINILA, M.; VIHKO, R., 1989).

5 Em situações de uso de contraceptivos hormonais, há um aumento
6 no risco do câncer de mama, cujo o efeito está relacionado mais uma vez a dose de
7 estrogênio do medicamento. Uma vez que, os contraceptivos hormonais produzidos
8 recentemente possuem doses diferenciadas e uma mistura hormonal, minimizando
9 este risco porém, que ainda é existente (PARL et al., 2018).

10 De acordo com a primeira gravidez a termo na mulher mais jovem,
11 este, apresenta menor risco de câncer de mama. Esta relação ainda é incerta mas
12 pode se explicar devido a completa diferenciação celular na glândula mamária
13 durante a gravidez a termo sendo uma proteção contra o desenvolvimento do
14 carcinoma ou certas mudanças duradouras no ambiente hormonal, como os níveis
15 de prolactina diminuídos, níveis mais elevados de globulina de ligação a hormônios
16 sexuais e níveis mais baixos de estrogênio total (BERNSTEIN et al., 1985).

17 Esta relação dos níveis mais baixos de estrogênio ou sua
18 biodisponibilidade com os fatores reprodutivos nos mostram a associação com as
19 mulheres nulíparas, onde os níveis máximos de estradiol que ocorre antes da
20 ovulação são maiores entre essas mulheres (KELSEY, J. L.; GAMMON, M. D.;
21 JOHN, E. M., 1993).

22 A obesidade também é um fator de risco, onde existe uma
23 correlação no aumento da concentração sérica de estrona e estradiol. As células
24 adiposas são ricas na enzima aromatase, a qual converte a estrona em
25 androstenediona que é aromatizada em estrogênio (WAJCHENBERG, 2000). Esta
26 produção parece ser afetada pela alimentação, visto que mulheres que consomem
27 menor quantidade de gordura e maior quantidade de fibras com baixo teor de
28 gordura apresentam redução significativa nos níveis de estradiol (CHATTERTON et
29 al., 2003).

30 Apesar de a prevenção do câncer de mama não ser algo totalmente
31 possível, pode-se controlar a exposição ou produção de alguns fatores de riscos
32 externos e estimular fatores protetores, visto que esses são possíveis de serem
33 alterados. Acredita-se que por meio de uma alimentação saudável, controlando o
34 peso e evitando a obesidade, com a prática de atividade física e evitar o consumo de

1 bebidas alcoólicas é possível reduzir em até 28% o risco das mulheres
2 desenvolverem a doença. A amamentação também é considerada um fator de
3 proteção (MINISTERIO DA SAÚDE, 2018).

4 5 2.3 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

6
7 O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as
8 mulheres no mundo todo. O carcinoma invasivo de mama consiste em um grupo de
9 tumores epiteliais malignos caracterizados pela invasão do tecido adjacente e com
10 elevada propensão à metástase (CARDOSO, M.; FRIZZO, M. N., 2015).

11 Os sinais e sintomas do câncer de mama podem variar, sendo eles
12 caracterizados por: nódulo único endurecido, irritação ou abaulamento de uma parte
13 da mama, inchaço de toda ou parte de uma mama, edema de pele, eritema,
14 inversão do mamilo, sensação de massa ou nódulo em uma das mamas, sensação
15 de nódulo aumentado na axila, espessamento ou retração da pele ou do mamilo,
16 secreção sanguinolenta ou serosa pelos mamilos, inchaço do braço e dor na mama
17 ou mamilo. No caso de vermelhidão, o inchaço na pele e o aumento de tamanho dos
18 gânglios axilares, pode ser decorrente do processo inflamatório ou infeccioso, como
19 a mastite, porém existe um tipo raro de câncer de mama que se manifesta como
20 uma inflamação, o câncer de mama inflamatório. Algumas mulheres não apresentam
21 os sinais e sintomas característicos da doença, daí a importância da mulher
22 reconhecer suas mamas para detectar qualquer alteração presente (ONCOGUIA,
23 2017).

24 Quando o nódulo é detectado ou é apresentado algum outro sintoma
25 característico da doença, deve-se investigar para confirmar se este é ou não um
26 tumor de mama. Exames de imagem podem auxiliar no diagnóstico como a
27 mamografia, ultrassonografia ou a ressonância magnética. A confirmação
28 diagnóstica é realizada através de biópsia, onde é retirado um pequeno fragmento
29 da lesão suspeita por punção e encaminhado para análise (MINISTERIO DA
30 SAÚDE, 2018).

31 O câncer de mama é uma doença de alta complexidade, de grande
32 variabilidade clínica, morfológica e biológica. Tumores mamários com histologia e
33 clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e respostas
34 terapêuticas. O carcinoma de mama possui uma diversidade de subtipos

1 moleculares que talvez possa justificar essas diferenças. Essa complexidade torna
2 difícil a definição de condutas clínicas, podendo por vezes propiciar tratamentos
3 inadequados (CIRQUEIRA et al., 2011).

4 Devido à alta complexidade do carcinoma de mama, houve a
5 necessidade da compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que
6 conduzem a demonstração do crescimento e progressão do tumor e com isso o
7 desenvolvimento de marcadores moleculares. Os marcadores tumorais são
8 substâncias que estão presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos
9 biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em
10 resposta à presença do tumor, cujo objetivo é diferenciar tecidos normais de
11 neoplásicos. Essas informações auxiliam no desenvolvimento de novos alvos
12 terapêuticos e também novas estratégias de tratamento (CARDOSO, M.; FRIZZO,
13 M. N., 2015).

14 Os biomarcadores validados para a prática rotineira diagnóstica no
15 câncer de mama até o momento são os receptores hormonais de estrogênio (ER) e
16 progesterona (PR), e o receptor de fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-
17 2). A avaliação rotineira desses três marcadores está indicada em todos os casos de
18 câncer de mama por comitês de consenso oncológicos internacionais, como a
19 Conferência de Saint Gallen 2011. O método imunohistoquímico é o mais utilizado,
20 com menor custo e que fornece informações prognósticas e preditivas (GOBBI,
21 2012).

22 Para a classificação do subtipo molecular do câncer de mama, o
23 perfil de expressão gênica é considerado o padrão-ouro, porém devido ao seu alto
24 custo, alguns países não possuem recursos para este fim. Assim, a anatomia
25 patológica conta com o teste de imunohistoquímica que, sendo menos complexo e
26 com custo menor, avalia a expressão protéica da morfologia do tumor e propicia a
27 avaliação da agressividade tumoral a partir da expressão de seus marcadores
28 (SERRA et al., 2014).

29 Baseado na coloração imunohistoquímica e perfis de expressão
30 gênica, os tumores de mama foram agrupados em quatro principais subtipos (Tabela
31 1). O subtipo luminal A consiste de tumores de melhor prognóstico, com baixo grau
32 histológico e responde por aproximadamente 70% dos cânceres de mama invasivos.
33 Tais tumores apresentam positividade para o receptor de estrogênio (ER) e/ou
34 receptor de progesterona (PR), são negativos para expressão de HER-2 e um índice

1 de fração proliferativa (Ki-67) inferior a 14%. Em seu tratamento são utilizadas as
2 terapias alvo-específicas com antiestrogênicos, como: tamoxifeno e inibidores de
3 aromatase (SOUZA et al., 2016).

4 Os tumores luminal B possuem um maior índice de proliferação
5 celular e, conseqüentemente, um pior prognóstico em relação aos tumores luminal
6 A. São caracterizados pela presença de, pelo menos, um receptor hormonal (ER
7 e/ou PR) e um índice de Ki-67 igual ou superior a 14%. O subtipo luminal B também
8 está associado com o maior risco de recorrência e uma menor sobrevida livre da
9 doença, e também, está associado a uma maior possibilidade de resistência ao
10 tamoxifeno respondendo melhor a quimioterapia (ADES et al., 2014).

11 Os tumores do subtipo HER-2 apresentam elevada expressão da
12 oncoproteína HER-2 e expressão negativa para receptores hormonais. Com base na
13 sua biologia, pacientes com este subtipo possuem o segundo pior prognóstico com
14 relação à agressividade, visto que este subtipo compreende aproximadamente 15%
15 dos cânceres de mama invasivos. No entanto, o tratamento de terapia alvo-
16 específica (como o anticorpo monoclonal trastuzumabe), melhora o prognóstico
17 dessas mulheres e coloca este subtipo dentre os de melhor prognóstico devido à
18 excelente resposta ao tratamento (BARROS, A. C. S. D. de; LEITE, K. R. M., 2015).

19 O subtipo triplo negativo demonstra alto grau histológico, elevado
20 índice mitótico, presença de áreas de necrose central e alta quantidade de infiltrado
21 linfocitário. Demonstra expressão negativa para receptores hormonais de estrogênio,
22 progesterona, não possui superexpressão de HER-2 e é caracterizado como o
23 subtipo de pior prognóstico em relação aos demais. Pacientes com esse perfil não
24 se beneficiam de tratamentos alvo-específicos, e usualmente são jovens ao
25 diagnóstico e apresentam associação com mutações genéticas como o BRCA 1 e/ou
26 BRCA 2 (DIECI et al., 2014).

27 Este conjunto de dados obtidos através desta classificação permite
28 que o especialista consiga ter um melhor planejamento estratégico na terapêutica do
29 câncer de mama, obtendo uma melhor eficácia na resposta terapêutica.

30
31
32
33
34

Tabela 1 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunohistoquímica dos tumores de mama

Subtipo molecular	Marcadores
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER-2- e Ki-67 < 14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER-2- e Ki-67 ≥ 14% RE+ e/ou RP+, HER-2+ (luminal HER2)
Superexpressão de HER-2	RE-, RP- e HER-2+
Triplo-negativo	RE-, RP-, HER-2-

1 **Legenda:** HER-2 = receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; RE =
2 receptor de estrogênio; RP = receptor de progesterona; Ki-67 = fração proliferativa.

3 **Fonte:** Adaptado de St. Gallen, 2011.

4

5 Outros fatores histopatológicos importantes incluem as
6 características observadas pelo patologista na biópsia do tumor de mama, e incluem
7 tamanho de tumor, grau histológico, presença de êmbolos angiolímfáticos e invasão
8 de linfonodos (TEIXEIRA, A. K. S.; VASCONCELOS, J. L. A., 2019).

9 O tamanho do tumor é avaliado de acordo com o maior diâmetro do
10 componente invasivo do tumor sendo utilizado para analisar o estadiamento do
11 câncer de mama pela classificação tumor, nódulo e metástase (Classificação TNM).
12 Também é descrito a porcentagem de ductos acometidos, e em situações de
13 tumores multicêntricos, a medida de referência é do maior tumor (MINISTÉRIO DA
14 SAÚDE, 2004).

15 No grau histológico, a definição é de acordo com o percentual de
16 diferenciação tubular, índice mitótico e a avaliação do pleomorfismo nuclear, e com
17 ele é possível prever se o câncer terá um crescimento mais lento ou mais rápido
18 podendo se disseminar. Essa comparação é realizada com a aparência da célula
19 tumoral se o tecido se parece mais com o tecido normal da mama ou com maior
20 diferenciação celular, variando de grau 1, sendo de melhor prognóstico, a grau 3 de
21 pior prognóstico (MEYER et al., 2005).

22 O espalhamento do tumor primário, dentre vários fatores, é
23 influenciado pela invasão de vasos sanguíneos, reportada nos laudos como
24 presença de êmbolos angiolímfáticos, e está diretamente associado ao processo de
25 metástases. O número de linfonodos acometidos nas cadeias que drenam o tumor

1 primário também é um importante fator de prognóstico, onde, um número maior de
2 linfonodos positivos está relacionado à maior chance de recidiva (PALMER et al.,
3 2019).

4 5 2.4 CÂNCER DE MAMA E INFLAMAÇÃO 6

7 Sabe-se que o câncer de mama é uma doença heterogênea e de
8 origem multifatorial. Assim, vários fatores influenciam seu desenvolvimento e
9 progressão, incluindo a inflamação crônica.

10 A inflamação é gerada a partir da exposição a agentes infecciosos,
11 ferimentos, agentes químicos, ressecção parcial de órgão, hormônios, células
12 adiposas devido ao sobrepeso, entre outros. Na inflamação há uma produção
13 exacerbada e persistente de citocinas pró-inflamatórias, que serão
14 contrabalanceadas pelas citocinas anti-inflamatórias visando a homeostasia do
15 organismo (YANG et al., 2018). No caso da inflamação crônica, ocorre uma
16 persistência dos fatores desencadeados ou uma falha no mecanismo necessário
17 para a finalização da resposta inflamatória, gerando um processo crônico persistente
18 de baixo grau. Com isso, os tecidos que sofreram a inflamação crônica são
19 reparados, resultando na replicação do DNA e na proliferação celular, ou ocorre a
20 apoptose. Por outro lado, este processo induz o acúmulo de mutações no DNA de
21 algumas células, gerando clones com perfis que podem dar origem ao câncer
22 (COUSSENS, L. M.; WERB, Z., 2002).

23 O excesso de gordura corporal , por sua vez, se destaca como um
24 dos fatores que desregulam o processo inflamatório (STOLARCZYK, 2017), onde
25 ocorre a ativação de macrófagos pró-inflamatórios no tecido adiposo, que estimulam
26 a produção de citocinas pro-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF-
27 α), interleucina-1 β (IL-1 β) e fatores associados à inflamação como a ciclo-oxigenase-
28 2 (COX-2) e a ativação de fator nuclear kappa B (NF-KB). Essas mudanças
29 inflamatórias podem estar relacionadas com a fisiopatologia do câncer de mama.
30 Sabe-se que a inflamação crônica nestas pacientes pode ser seguida por indução da
31 expressão de aromatase de células estromais mamárias (ROSE, D. P; VONA-
32 DAVIS, L., 2013). Com isso, a disponibilidade de estrogênio extra-gonadal tende a
33 ser maior, servindo de combustível para o tecido tumoral da mama.

1 As citocinas pró-inflamatórias produzidas no contexto da inflamação
2 crônica podem levar ao crescimento de tumores e metástase, alterando a biologia
3 celular tumoral e ativando as células do estroma mamário, como células endoteliais
4 vasculares, aumentando o extravasamento através da vasculatura (COLE, 2016).

5 Há também a relação do excesso de gordura corporal com o risco de
6 desenvolvimento do câncer de mama em mulheres pós-menopausadas. As células
7 adiposas são o principal local de metabolização do estrógeno nas mulheres e se há
8 excesso de gordura corporal ou índice de massa corporal (IMC) elevado haverá um
9 aumento do nível de estrógeno e das concentrações séricas do fator de crescimento
10 semelhante à insulina (IGF-1). Estes fatores associados à síntese de citocinas
11 inflamatórias levam à progressão do ciclo celular e à inibição da apoptose, com
12 possibilidade da promoção da superexpressão de oncogenes associados ao
13 desenvolvimento do câncer de mama (INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A. DA;
14 NAVES, M. M. V, 2011).

15 Dentro do processo inflamatório crônico, sabe-se ainda que a
16 produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERs) têm
17 um papel importante na manutenção da instabilidade genômica do tumor de mama,
18 causando quebra das pontes de hidrogênio, alterações nas bases de guanina e
19 timina e cromátides irmãs. Isso pode levar a inativação dos genes supressores
20 tumorais, ou ainda, aumentar a expressão de proto-oncogenes potencializando
21 assim a malignidade tumoral (BROWN, N. S.; BICKNELL, R., 2001).

22 Existem algumas razões para que aconteça o desequilíbrio entre a
23 produção e neutralização das ERs, denominado estresse oxidativo, sendo elas: o
24 aumento da ativação de fagócitos, a interrupção da transferência de elétrons na
25 cadeia respiratória mitocondrial, o aumento dos níveis de íons metálicos do
26 grupamento heme de proteínas no local da lesão e também por uma diminuição das
27 defesas antioxidantes. Apesar desde desequilíbrio sabe-se da importância das ERs
28 no organismo em condições fisiológicas, pois estas possuem funções de sinalização
29 intracelular e estão associadas à regulação redox do sistema imune (FILIPPIN, L. I.;
30 VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M., 2008).

31

32

33

1 2.5 BIOQUÍMICA DO NO[•]

2
3 Os radicais livres são produzidos em excesso na inflamação sendo
4 encontrados centrados nos átomos de oxigênio e nitrogênio, esse desequilíbrio entre
5 o desafio oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é
6 denominado de estresse oxidativo (KHANNA et al., 2014).

7 Dentre as ERs produzidas nos processos fisiológicos e patológicos,
8 destaca-se no óxido nítrico (NO[•]). O NO[•] é um gás incolor, moderadamente solúvel
9 em água e mais solúvel em solventes orgânicos. Conseqüentemente, tem a
10 capacidade de atravessar membranas e se difundir rapidamente entre e dentro das
11 células (THOMAS et al., 2015). Devido à presença de um elétron desemparelhado, o
12 NO[•] é considerado uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), e a partir dos
13 metabólitos formados da sua reação com outras ERs, ele consiste no principal
14 mediador do estresse nitrosativo (BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.
15 P., 2006).

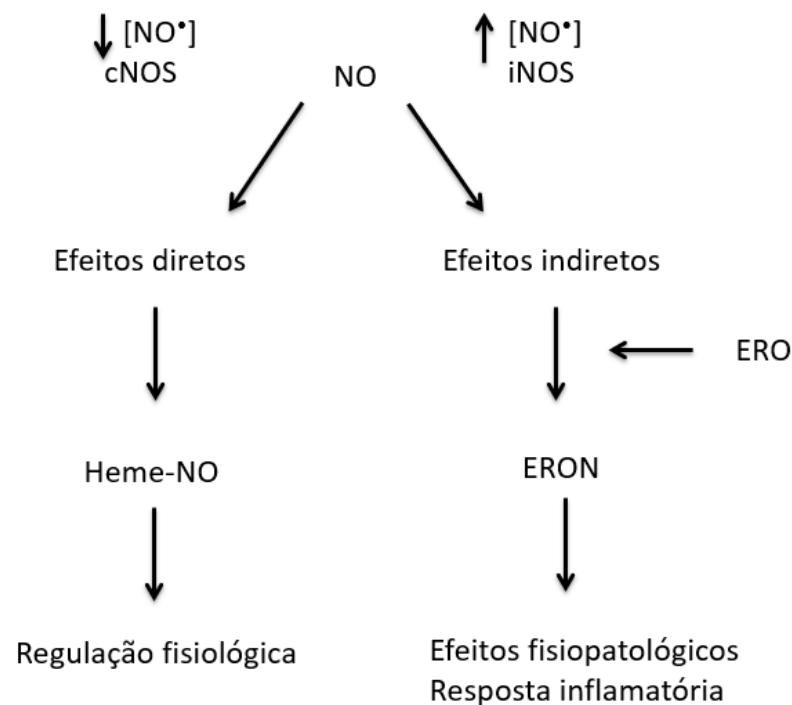
16 O NO[•] é produzido a partir de L-arginina e oxigênio em reação
17 catalisada pelas Óxido Nítrico Sintases (NOS) e é, subseqüentemente, oxidado a
18 nitrito e nitrato. O nitrato pode ser reduzido a nitrito, e o nitrito pode ser, ainda,
19 reduzido a NO[•], um efeito que é acentuado quando a disponibilidade de oxigênio no
20 tecido é baixa. Desta forma, os produtos de produção de NO[•] pode ser reciclados.
21 Além da produção endógena, as reservas corporais de nitrato e nitrito podem ser
22 aumentadas por meio do consumo de alimentos ricos em nitrato inorgânico (JONES,
23 A. M., 2014).

24 Existem três diferentes genes que, nos mamíferos, codificam três
25 isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS, codificado pelo gene NOS1); NOS indutor
26 (iNOS, codificado pelo gene NOS2); e NOS endotelial (eNOS, codificado pelo gene
27 NOS3). NOS1 e NOS3 são expressos em sua maioria em neurônios e células
28 endoteliais, respectivamente; enquanto NOS2 tem sua principal expressão em
29 células imunes (MUNGRUE et. al., 2003). Os genes para as três isoformas de NOS
30 são encontrados em três cromossomos diferentes. O gene que codifica para a nNOS
31 (NOS1) está localizado no cromossomo 12; o gene que codifica para a eNOS
32 (NOS3) se encontra no cromossomo 7; e o gene que codifica a enzima iNOS
33 (NOS2) está em ambos os lados do centrômero no cromossomo 17 (NATHAN, C.;
34 XIE, Q-W, 1994).

1 O NO[•] possui um papel fisiológico importante no organismo como,
2 por exemplo, no sistema cardiovascular. O NO[•] derivado do endotélio, sintetizado
3 pela NO[•] sintase endotelial (eNOS), tem grande poder vasodilatador e tem papel
4 fundamental no tônus vascular e na manutenção da pressão sanguínea (ZHAO et.
5 al., 2015). No sistema nervoso central, o NO[•] derivado dos neurônios, sintetizado a
6 partir da NO[•] sintase neuronal (nNOS), tem influência em várias funções cerebrais,
7 como a cognição e a resposta ao stress (PHILLIPU, 2016). Tanto eNOS como nNOS
8 são chamadas de NO[•] sintase constitutivas (cNOS) e são cálcio-dependentes,
9 diferenciando-as da forma induzível (iNOS) que é cálcio-independente e está
10 associada a diversos processos patológicos.

11 As reações do NO[•] dependem especialmente de sua velocidade de
12 formação e da sua inativação ou conversão em outras espécies reativas em um sitio
13 determinado. Os efeitos biológicos do NO[•] podem ser diretos ou indiretos. Os
14 efeitos diretos podem ser produzidos pela interação de NO[•] com o grupo heme, ou
15 pelo seu efeito direto no endotélio como vasodilatador, sendo esse processo
16 responsável pelos seus efeitos fisiológicos. Os efeitos indiretos, ocorrem quando há
17 grande produção de NO[•], e geralmente é associado à resposta inflamatória que leva
18 à formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, conforme demonstrado na
19 Figura 2 (GRENFELL, A. M. G; GONZALEZ, A. V.; VARGAS, M. P. S., 2006).

20



1

2 **Figura 2** – Efeitos biológicos diretos e indiretos do óxido nítrico.

3 **Legenda:** NO• = óxido nítrico; cNOS = óxido nítrico sintase constitutiva; iNOS: óxido
 4 nítrico sintase induzível; ERON = espécie reativa de oxigênio e nitrogênio; ERO =
 5 espécie reativa de oxigênio; Heme-NO = interação de óxido nítrico com o grupo
 6 heme.

7 **Fonte:** Adaptado de Alberto M. G. Grenfell, Angélica V. González, Martha P. S. Vargas
 8 (2006).

9

10 As ERN abrangem o NO•, o dióxido de nitrogênio (NO₂•), trióxido de
 11 dinitrogênio (N₂O₃), tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄) e peroxinitrito (•ONOO•). Estas
 12 substâncias são capazes de realizar diversas reações como nitrosação, nitrosilação,
 13 oxidação, hidroxilação e nitração de várias biomoléculas. Tais reações também
 14 fazem parte do processo fisiológico da célula; porém, durante a inflamação
 15 exacerbada pode haver uma produção aumentada destas espécies, superando os
 16 mecanismos de proteção do organismo contra as ERNs, favorecendo o estresse
 17 nitrosativo (Figura 3) (GRENFELL, A. M. G; GONZALEZ, A. V.; VARGAS, M. P. S.,
 18 2006).

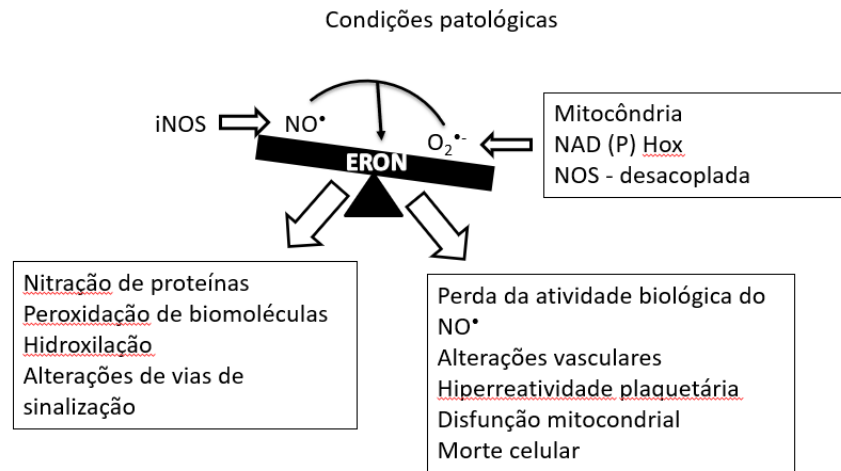


Figura 3 – Alterações bioquímicas no estresse nitrosativo.

Fonte: Adaptado de Alberto M. G. Grenfell, Angélica V. González, Martha P. S. Vargas (2006).

A principal reação do NO^\bullet discutida na literatura é a que ocorre com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) resultando em peroxinitrito (ONOO^-), uma espécie altamente reativa que é danosa ao DNA e outras biomoléculas. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é produzido no organismo a partir da mitocôndria na respiração celular e da ativação do sistema imune pela imediação da NADPH, e é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Caso o $\text{O}_2^{\bullet-}$ não seja dismutado pela SOD, ele pode reagir com o NO^\bullet formando o ONOO^- . A SOD é uma enzima com capacidade antioxidante induzível por citocinas pró-inflamatórias através da via do NF- κ B. A SOD, que existe na mitocôndria é conhecida como manganês-SOD (MnSOD), e sua forma constitutiva que é cobre-zinco-SOD. Por fim, a adição do ONOO^- às biomoléculas das células, pode levar a uma protonação que ocasiona a depleção de grupos-SH e outros antioxidantes, oxidação e nitração de lipídeos, quebra do DNA, nitração e desaminação de bases de DNA (FILIPPIN et al., 2008).

Inicialmente, o papel do NO^\bullet na fisiopatologia das doenças era discutido principalmente nos processos infecciosos. Entretanto, a descoberta das suas funções no câncer trouxe avanços importantes no entendimento da biologia de tumores.

2.6 FISIOPATOLOGIA DO EIXO NO[•] EM CÂNCER DE MAMA

O papel do NO[•] no câncer de mama vem sendo discutido nas últimas décadas, e envolve não somente as ERNs, mas também as enzimas envolvidas na sua síntese. A biossíntese de NO[•] e a atividade da NOS são encontradas no tecido tumoral da mama de forma aumentada, quando comparadas com lesões benignas e tecido mamário normal, onde a atividade é baixa ou não detectável (THOMSEN, et al., 1995). A iNOS foi identificada como um possível biomarcador da progressão da doença do câncer de mama e esteve relacionada à sobrevida das pacientes. Sabe-se ainda que existe uma correlação entre a atividade da enzima iNOS e o grau de diferenciação do tumor (HEINECKE et al., 2014).

A iNOS pode alterar o estado redox das células, induzir modificações de DNA, lipídios e proteínas, promover um microambiente imunossupressor e mediar a angiogênese, eventos necessários para a progressão tumoral. O tecido canceroso que superexpressa a iNOS tem sido associado com desfechos de pior prognóstico. Existe uma correlação positiva entre a expressão da iNOS e a ativação de vias de sinalização associadas à proteína quinase B (AKT), sugerindo uma ligação mecânica com a sinalização de sobrevivência dentro do tumor. A sinalização nitrosativa aqui é mediada por ERNs, como o N₂O₃. A ativação da SOD, visando eliminar o [•]O₂⁻ e prevenir a formação de [•]ONOO⁻ aumenta ainda mais a fosforilação de AKT. (BASUDHAR et al., 2017).

A nitração seletiva parece levar ao desenvolvimento de fenótipos específicos no câncer de mama. Pesquisadores demonstraram que eventos de nitração correlacionados com a ativação da via AKT mediada por NO[•] reduziram a sobrevida de pacientes com câncer de mama ER negativo com alta expressão de iNOS (RINDNOUR et al., 2012).

Além disso, parece existir uma relação antagônica entre as moléculas [•]O₂⁻ e NO[•] durante a sinalização nitrosativa em células de câncer de mama. Assim, de forma isolada, o NO[•] e o [•]O₂⁻ são antagonistas mútuos de suas respectivas vias de sinalização, que podem ser exploradas pelas células tumorais para manutenção de condições ótimas de sinalização redox que promovem sua sobrevivência e crescimento (THOMAS et al., 2015).

A ativação da via do NO[•] é influenciada pela via da quinase regulada pelo sinal extracelular (ERK) e AKT, bem como pela estabilização do fator induzível

1 por hipóxia 1 alfa (HIF-1a), que ocorre em níveis que variam de 200 a 500 nM no
2 estado estacionário do NO[•]. A ativação de outras vias como a fosfoinositol 3-quinase
3 (PI3k)/ AKT, a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), o receptor do fator de
4 crescimento epidérmico (EGFR) e a proteína c-ets-1 (Ets-1) promovem a progressão
5 da doença, sendo todas alvos de NO[•]. A inibição de enzimas envolvidas no reparo
6 do DNA também ocorre em maior fluxo de NO[•], por conta dos danos ocasionados
7 pelo estresse nitrosativo no núcleo (BASUDHAR et al., 2017).

8 A forma de detecção do NO[•] em amostras biológicas ainda é um
9 desafio, devido a mínima concentração e da meia-vida extremamente curta desta
10 substância, em torno de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos
11 (ARCHERS, 1993). Com isso, estão descritos em literatura dosagens diretas e
12 indiretas, no ensaio direto é utilizado uma metodologia complexa como a
13 ressonância eletrônica paramagnética (EPR), a quimioluminescência e por detecção
14 eletroquímica (KIECHLE, F. L.; MARLINSKI, T., 1993). Já a determinação indireta é
15 a dosagem de nitrato e nitrito através do plasma ou da urina, como os produtos da
16 reação do NO[•] com o oxigênio (O₂), da GMPc, do co-produto (L-citrulina), da
17 detecção de nitrosil hemoglobina (NO[•]-hB) nas hemácias circulantes, da
18 quantificação histoquímica da NOS, da determinação da atividade da NOS, do uso
19 de inibidores da NOS e da detecção de resíduos de 3-nitrotirosina, formados pela
20 ação do [•]ONOO⁻ sobre os resíduos tirosina das proteínas (DUSSE, 1998).

21 Em termos clínicos, sabe-se que estas alterações, o aumento da
22 produção de NO[•] e a vascularização, podem impactar a agressividade do tumor de
23 mama. Estudos do nosso grupo demonstram que o NO[•] é um mediador produzido
24 em pacientes com câncer de mama, especialmente em estádios avançados da
25 doença (PANIS et al., 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre a existência de uma
26 possível correlação clínica entre os níveis circulantes de NO[•] e os parâmetros
27 clínicos associados ao prognóstico do câncer de mama.

28
29
30
31
32
33
34
35
36

4 MATERIAIS E MÉTODOS

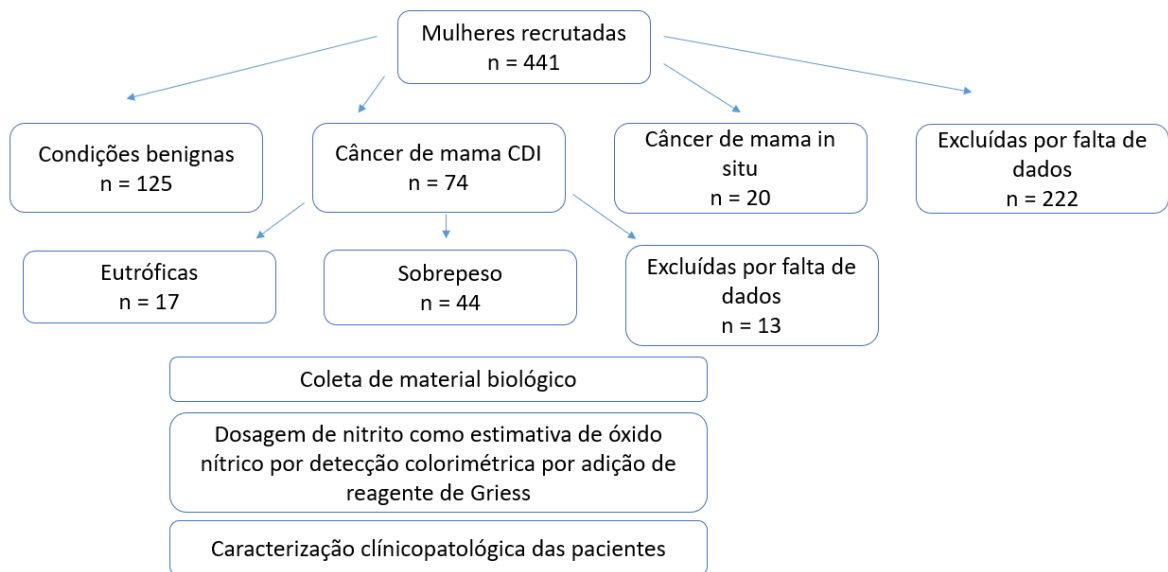
4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo longitudinal misto (retrospectivo - amostras já coletadas e prospectivo - amostras novas a serem coletadas), do tipo observacional. Esta proposta faz parte do projeto aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número CAAE 35524814.4.0000.0107, parecer número 810.501. Todas pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A população do estudo foi de 441 mulheres voluntariadas com diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante da mama atendidas pelo ambulatório do Hospital de Câncer de Francisco Beltrão-PR (Ceonc), no período de agosto de 2016 a outubro de 2018. Este Hospital atende pacientes oriundas dos 27 municípios que compõem a 8ª Regional de Saúde do Paraná. Foram utilizados como critérios de inclusão: pacientes do sexo feminino encaminhadas para procedimento cirúrgico portadoras de lesões sugestivas de carcinoma ductal infiltrante mamário (CDI) unilateral em qualquer estadiamento clínico (imagem com classificação Biradis IV ou V). Como critério de exclusão foram utilizados: pacientes que não se encontravam dentro do critério de inclusão e também que não apresentavam todos os dados clínicos e tumorais determinados para o estudo.

Dessas pacientes, 125 mulheres se encontravam em condições benigna, 74 com carcinoma ductal infiltrante, 20 com câncer de mama in situ e 222 foram excluídas pois não apresentavam qualquer um dos dados clínicos ou tumorais determinados para o estudo. As 74 pacientes com carcinoma ductal infiltrante foram subdivididas em pacientes eutróficas (17) e excesso de peso (44) de acordo com seus valores de índice de massa corpórea (IMC), sendo excluídas mais 13 mulheres que não apresentavam esses dados.

Um volume de 5 mL de sangue foi coletado das pacientes voluntariadas em tubo de ensaio a vácuo heparinizado priorizando as pacientes sem quimioterapia prévia. A figura 1 mostra um fluxograma no qual é apresentado o desenho do estudo.



1
2 **Figura 1 – Desenho do estudo.**

3
4 Os prontuários médicos foram consultados para obtenção de dados
5 clinicopatológicos necessários para estudo do perfil clínico das pacientes.

6 Determinou-se a partir dos dados clínicos obtidos durante a consulta
7 médica e em registro de prontuário, os seguintes itens: idade ao diagnóstico
8 (categorizada abaixo ou acima de 50 anos), índice de massa corporal – IMC
9 (categorização definida pela OMS, sendo eutrófico ($\geq 18,5$ e < 26) e sobrepeso (\geq
10 26.1)), status menopausal ao diagnóstico, tipo de tratamento instituído e,
11 estadiamento tamanho-nódulo-metástase (TNM).

12 Para categorização histopatológica foram adotados os critérios de
13 avaliação relacionados ao grau histológico (1 - bem diferenciado, 2 –
14 moderadamente diferenciado ou 3 – pouco diferenciado), envolvimento de bordos
15 (sim ou não) e presença ou ausência de êmbolos angiolímfáticos intratumorais.
16 Também foi utilizado o dado referente à caracterização macroscópica da biópsia no
17 que se refere ao tamanho do tumor e, número de linfonodos positivos para células
18 tumorais à análise em microscopia.

19
20 **4.2 SUBTIPAGEM MOLECULAR POR IMUNOHISTOQUÍMICA**

21
22 Para realização desta etapa, utilizou-se o material obtido em biópsia
23 ou agulhamento para estabelecer os subtipos moleculares segundo critérios
24 estabelecidos pelo consenso de StGallen (GOLDHIRSCH, 2013) através da

1 marcação imunohistoquímica dos tumores. Pesquisou-se a presença de receptores
2 de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR), amplificação do receptor do
3 fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2, confirmado através da técnica de
4 hibridização *in situ* fluorescente – FISH quando seu score foi igual a 2) e índice de
5 proliferação celular ki67. Desta forma foi estabelecido o subtipo molecular de cada
6 tumor dentro de 5 categorias, através dos seguintes critérios:

7 a) Subtipo Luminal A: Categorizado como luminal A todo tumor que
8 apresentou positividade acima de 1% para a expressão de receptores de estrógeno
9 e/ou progesterona, com HER-2 negativo e ki67 abaixo de 14%.

10 b) Subtipo Luminal B: Categorizado como luminal B todo tumor que
11 apresentou positividade acima de 1% para a expressão de receptores de estrógeno
12 e/ou progesterona, com HER-2 negativo e ki67 acima de 14%.

13 c) Subtipo Luminal Híbrido: Categorizado como luminal híbrido todo tumor
14 que apresentou positividade acima de 1% para a expressão de receptores de
15 estrógeno e/ou progesterona, com expressão de HER-2 positivo e qualquer valor de
16 ki67.

17 d) Subtipo HER-2 amplificado: Categorizado como HER-2 amplificado
18 todo tumor que apresentou negatividade para a expressão de receptores de
19 estrógeno e/ou progesterona, com score de marcação de HER-2 maior que 2+ ou
20 ainda com 2+ com amplificação confirmada pela técnica de FISH associado a
21 qualquer valor de ki67.

22 e) Subtipo triplo negativo: Categorizado como triplo negativo todo tumor
23 que apresentou negatividade para a expressão de ER, PR e HER-2, independente
24 do valor de ki67.

25 26 4.3 ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO[•]) 27

28 O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por
29 reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema
30 cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do
31 azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550nm. Para uso no
32 ensaio, 60µL de amostra foram adicionados a 50µL de ZnSO₄ 75mM, centrifugadas
33 por 2 minutos a 10000 rpm a 40C. e 70µL de 55mmol/L NaOH, novamente
34 centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm a 40C, com posterior recuperação de

1 150µL do sobrenadante, adicionando-se 50µL de tampão glicina-NaOH 45g/L pH
2 9,7. Grânulos de cádmio foram ativados em CuSO_4 5mM por 5 minutos e
3 adicionados ao sobrenadante coletado das amostras desproteinizadas durante 10
4 minutos, sob agitação. Em microplaca, adicionou-se 50µL de amostra a 50µL de
5 Reagente de Griess (Sulfanilamida: 0,4g sulfanilamida em 20mL ácido Fosfórico 5%
6 - protegido da luz; NEED: 40mg em 20mL H_2O destilada). Em seguida, a placa foi
7 incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos e medida sua absorvância a
8 550nm em leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em µM de nitrito
9 (PANIS, et al. 2012).

10 Os resultados obtidos nas estimativas de NO^* das amostras foram
11 confrontados de acordo com o IMC (categorização definida pela OMS, sendo
12 eutrófico ($\geq 18,5$ e < 26) e sobrepeso ($\geq 26,1$)) para investigação de possíveis
13 correlações com os seguintes parâmetros clinicopatológicos: idade ao diagnóstico,
14 tamanho do tumor, grau histológico, padrão de receptores expressos e subtipo
15 molecular, invasão linfonodal, presença de êmbolos angiovasculares, status
16 menopausal e positividade de linfonodos.

17

18 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

19

20 Todas as amostras analisadas tiveram os resultados submetidos à
21 análise de valores outliers pelo teste de Grubbs. As variáveis qualitativas e
22 quantitativas foram analisadas através do software GraphPadPrism 7.0 e SPSS
23 2.5.0.0 utilizando-se análises de variância ANOVA, teste t de Student e teste de
24 Mann-Whitney, conforme indicação estatística segundo verificação da distribuição
25 dos resultados e comparação entre os desvios dos grupos, para posterior escolha do
26 teste de significância mais adequado a ser empregado. Foi considerada significativa
27 a diferença entre os grupos com $p \leq 0,05$.

28

29

30

31

32

33

34

1
2 **Original Article**

3
4 **Circulating Nitric Oxide Products As Prognostic Markers In Overweight Women With**
5 **Breast Cancer.**

6 Pâmella Aparecida Ferreira Fagotti¹, Vitor Maito Teixeira², Bruno Vinicius Campestrini²,
7 Thalita Basso Scandolaro^{2,3}, Janaína Carla Silva², Janoário Athanázio de Souza⁴, Daniel
8 Rech^{2,4}, Carolina Panis^{1,2}.

9
10 ¹Post-Graduation Program in Clinical and Laboratorial Physiopathology, State University of
11 Londrina, Londrina – Paraná, Brazil.

12 ²Laboratory of Tumor Biology, State University of Western Paraná, UNIOESTE, Francisco
13 Beltrão – Paraná, Brazil.

14 ³Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.

15 ⁴Francisco Beltrão Cancer Hospital, CEONC, Francisco Beltrão-Paraná, Brazil.

16
17
18 **Corresponding author**

19 Carolina Panis, PhD

20 Universidade Estadual do Oeste do Paraná

21 Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de Biologia de Tumores

22 Rodovia Vitório Traiano, Km2 – Água Branca

23 Francisco Beltrão, Paraná, Brazil

24 Phone +55 46 35200715 - Email: carolpanis@hotmail.com

25 **The authors have no conflicts to declare.**

26 Funding: Programa de Pesquisa Para o SUS – PPSUS, Coordenação de Aperfeiçoamento de
27 Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Bolsas de Produtividade em Pesquisa e
28 Desenvolvimento Tecnológico, Fundação Araucária.

29
30
31
32
33
34
35
36

1
2 **ABSTRACT**
3

4 **Introduction:** Breast cancer is a multifactorial and heterogeneous disease, in which the
5 determinants of tumor aggressiveness, as well as its relationship with the clinical
6 characteristics of the disease, are still under investigation. Among the several inflammatory
7 mediators that are enrolled in disease progression, nitric oxide (NO[•]) axis stands out as a
8 pivotal player.

9 **Objectives:** Circulating levels of nitrite, a NO[•] metabolite, were measured and correlated with
10 clinicopathological parameters of poor prognosis in patients with ductal breast cancer.

11 **Materials and methods:** This study included 61 women diagnosed with infiltrating ductal
12 breast cancer (ICD) who underwent diagnostic surgery at the Francisco Beltrão Cancer
13 Hospital. All patients signed consent forms. NO[•] estimative was performed on plasma samples
14 through the cadmium-copper-Griess method, and categorized according to the age at
15 diagnosis, body mass index, menopausal status, tumor histological features and its molecular
16 subtype, lymphnodal invasion and emboli presence, considering $p \leq 0.05$ as significant.

17 **Results:** The mean NO[•] plasmatic levels as an estimate of nitrite was $51.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$. A
18 significant increase was observed in NO[•] levels from patients carrying Luminal B tumors,
19 when comparing the overweighted ($67.3 \pm 10 \mu\text{M}$, $p = 0.035$) with the eutrophic ones ($29.1 \pm$
20 $7.7 \mu\text{M}$). There was also a significant difference between eutrophic postmenopausal women
21 ($39.4 \pm 4.9 \mu\text{M}$) and overweight postmenopausal women ($57.1 \pm 5.4 \mu\text{M}$, $p = 0.0510$), and
22 patients bearing tumor size between 2 and 5 cm in eutrophic ($38.1 \pm 4.2 \mu\text{M}$) and in
23 overweight ($54.7 \pm 4.6 \mu\text{M}$, $p = 0.052$). **Conclusion:** There is a significant difference in
24 plasmatic NO[•] levels when considering the trophic condition of breast cancer patients, and it
25 is further affected by prognostic factors that are related with poor prognosis.
26
27
28

29 **Key words:** Breast Cancer, Nitric Oxide, Overweight
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

1 1 INTRODUCTION

2 Breast cancer is a public health problem, and consists in the main malignant
3 neoplasia that kills women in Brazil [1]. Several factors have been reported as potential
4 promoters of this process, including chronic inflammation [2]. During inflammation, there is a
5 production of very active mediators, as free radicals, which are capable of affect its
6 progression [3].

7 Free radicals are a group of potent reactive species, capable to change the
8 conformation of biological molecules and affect its functioning. The overproduction of such
9 species during the inflammatory response results in an imbalance between the pro-oxidants
10 generation and its neutralization, giving rise to a condition called oxidative stress [4].

11 Among the reactive species produced, nitric oxide (NO^\bullet) and its metabolites
12 have been reported as important mediators that have dual functions. At low levels, in
13 physiological concentrations, NO^\bullet can have direct effects by regulating physiological
14 processes such as vasodilation, learning, cognitive memory, and apoptosis. However, at
15 increased levels, such as in chronic inflammation, it may have indirect effects on the
16 pathophysiology of diseases by being converted to the peroxynitrite molecule ($^\bullet\text{ONOO}^-$) and
17 other products, causing the nitrosative stress [5].

18 Excessive production of NO^\bullet has been reported in several diseases,
19 including breast cancer [6]. Studies suggest that NO^\bullet levels may vary in breast cancer
20 depending on clinicopathological characteristics, as disease staging and chemotherapeutic
21 treatment [7]. In spite of this, few is reported in literature regarding NO^\bullet levels when
22 considering other clinicopathological parameters determinant for breast cancer aggressiveness
23 as the body mass index, tumor molecular subtype, tumor size, and lymphnodal metastasis.

24 Considering that excessive body fat stands out as one of the main factors
25 that deregulate the inflammatory process [8], are the major site of estrogen metabolism [9],

1 and constitutes an important source of NO[•] [10], the aim of this study was to establish the
2 comparative plasmatic nitrite levels between euthrophic and overweight patients with breast
3 cancer, and correlate them with clinical findings that are determinant for disease prognosis.
4
5
6
7
8
9
10

1 2 MATERIALS AND METHODS

2 2.1 STUDY DESIGN

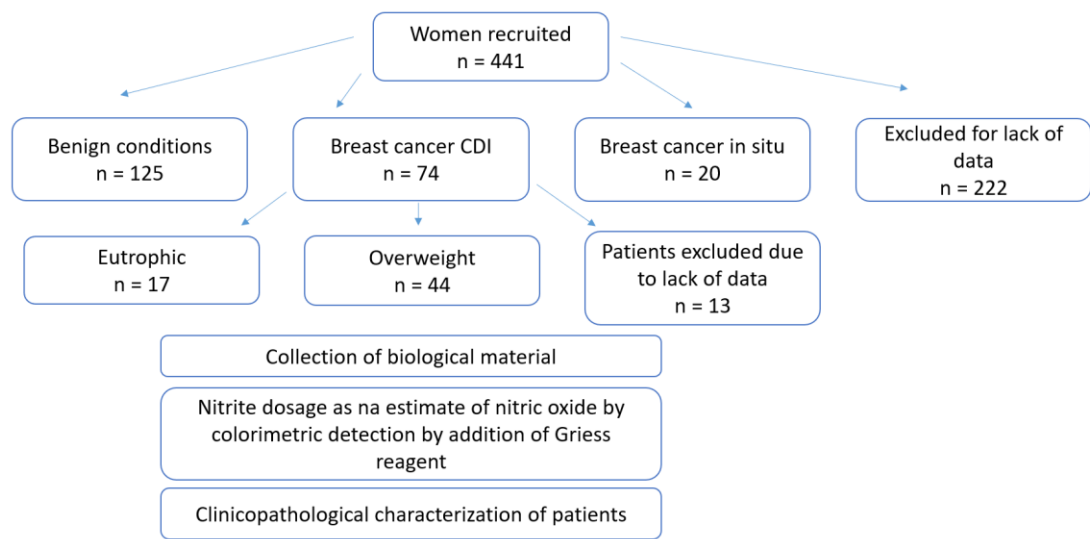
3

4 This is a mixed longitudinal (retrospective and prospective) observational
5 and exploratory study. This proposal is part of the project approved by the National Research
6 Ethics Commission (CONEP) of the State University of Western Paraná (UNIOESTE) under
7 number CAAE 35524814.4.0000.0107, opinion number 810.501. All patients gave written
8 informed consent.

9 The study population consists of 441 volunteer women diagnosed with
10 infiltrating ductal carcinoma seen at the Francisco Beltrão Cancer Hospital (Ceonc) outpatient
11 clinic, from August 2016 to October 2018. Those who had incomplete data were excluded
12 from the study and 61 women remained as the final sample size. This hospital serves patients
13 from the 27 municipalities that make up the 8th Regional Health of Paraná. Inclusion criteria
14 were: female patients referred for surgery with lesions suggestive of unilateral infiltrating
15 breast ductal carcinoma (ICB) at any clinical stage (Biradis IV or V-classified image).
16 Exclusion criteria: it was the patients who did not have all the data of interest within the
17 medical records.

18 These patients, 125 were in benign conditions, 74 were ICB, 20 were breast
19 cancer in situ and 222 were excluded because they did not have any of the clinical or tumor
20 data determined for the study. The 74 patients with infiltrating ductal carcinoma were
21 subdivided in eutrophic (17) and overweight (44) according to their body mass index (BMI)
22 values, and more 13 women were excluded because they did not have these data.

23 A volume of 5 mL of blood was collected in a heparinized vacuum test tube
24 from the volunteer patients, prioritizing patients without prior chemotherapy. Figure 1 shows
25 a flowchart in which the study design is presented.



1

2 **Figure 1** – Flowchart of study design

3

4 The medical records were consulted to obtain clinicopathological data
5 necessary to study the clinical profile of the patients.

6

7 The following parameters were determined from the information obtained
8 during medical consultation and medical record: age at diagnosis (categorized below or above
9 50 years), body mass index - BMI (categorization defined by OMS, being eutrophic (≥ 18.5
10 and < 26) or overweight (≥ 26.1)), performed by calculating weight divided by height
11 squared, menopausal status at diagnosis, type of treatment instituted, and size, nodule,
12 metastasis (TNM) staging [11]. For the histopathological categorization, the evaluation
13 criteria adopted was related to the histological grade (1 - well differentiated, 2 - moderately
14 differentiated or 3 - poorly differentiated), border involvement (yes or no) and presence or
15 absence of intratumor angiolymphatic emboli. Data on macroscopic characterization of the
16 biopsy regarding tumor size and number of lymph nodes positive for tumor cells were also
17 used.

2.2 MOLECULAR SUBTYPING BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Biopsy or needling material was used to establish molecular subtypes according to criteria established by St Gallen consensus [12] through immunohistochemical labeling of tumors. The presence of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), human epidermal growth factor 2 receptor (HER-2) amplification was confirmed by fluorescence in situ hybridization (FISH) when its score was 2) and cell proliferation index Ki67. Thus was established the molecular subtype of each tumor within 5 categories, by the following criteria:

a) Luminal A subtype: Categorized as luminal all tumors that presented positivity above 1% for estrogen and / or progesterone receptor expression, with negative HER-2 and Ki67 below 14%.

b) Luminal B subtype: Categorized as luminal B any tumor that presented positivity above 1% for estrogen and / or progesterone receptor expression, with negative HER-2 and Ki67 above 14%.

c) Hybrid Luminal Subtype: Categorized as luminal hybrid any tumor that presented positivity above 1% for estrogen and / or progesterone receptor expression, with positive HER-2 expression and any Ki67 value.

d) Amplified HER-2 subtype: Categorized as HER-2 amplified any tumor that was negative for estrogen and progesterone receptor expression, with HER-2 score greater than 2+ or with 2+ with amplification. confirmed by the FISH technique associated with any value of Ki67.

e) Triple negative subtype: Categorized as triple negative every tumor that presented negativity for the expression of ER, PR and HER-2, regardless of the value of Ki67.

2.3 MEASUREMENT OF NITRIC OXIDE (NO[•]) LEVELS

The method is based on the reduction of nitrate to nitrite mediated by oxide-reduction reactions occurring between the nitrate present in the sample and the cadmium-copper reagent system, with subsequent diazotization and colorimetric detection of the azo compound by addition of Griess reagent at 550nm. This sample was centrifuged and for use in the assay, 60µL of plasma was added to 50µL of 75mM ZnSO₄, centrifuged for 2 minutes at 10,000 rpm. and 70µL of 55mmol / L NaOH, again centrifuged for 5 minutes at 10,000 rpm, with subsequent recovery of 150µL of the supernatant, adding 50µL of 45g / L glycine-NaOH buffer pH 9.7. Cadmium granules were activated in 5mM CuSO₄ for 5 minutes and added to the supernatant collected from the deproteinized samples for 10 minutes while stirring. In microplate, 50µL of sample was added to 50µL of Griess Reagent (Sulfanilamide: 0.4g sulfanilamide in 20mL 5% light-protected phosphoric acid; naphthyl ethylenediamine dihydrochloride (NEED): 40mg in 20mL distilled H₂O). The plate was then incubated at room temperature for 10 minutes and its absorbance at 550nm measured in a microplate reader. Results were expressed as µM nitrite, using a standard curve of nitrite as reference [7].

The results obtained in the NO[•] estimates of the samples were compared according to BMI (categorization defined by OMS, being eutrophic (≥ 18.5 and < 26) and overweight (≥ 26.1) to investigate possible correlations with the following clinicopathological parameters: age at diagnosis, tumor size, histological grade, expressed receptor pattern and molecular subtype, lymph node invasion, presence of angiovascular emboli, menopausal status and lymph node positivity.

2.4 STATISTICAL ANALYSIS

All samples analyzed were subjected to outlier analysis by Grubbs test. Qualitative and quantitative variables were analyzed using GraphPadPrism 7.0 and SPSS

1 25.0.0 software (United States). using analysis of variance ANOVA, Student's t-test and
2 Mann-Whitney test, as statistical indication according to verification of the distribution of
3 results performed through the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and comparison between
4 the deviations of the groups, for later choice of the most appropriate significance test to be
5 employed. It was considered a $p \leq 0.05$ as significant.

6

7

8

9

10

11

12

13

1 3 RESULTS

2 Table 1 shows the clinicopathological data of the patients included in the
3 study, subdivided according to their BMI categorization as eutrophic or overweight (all
4 patients with BMI >26 kg/m²). In both groups, the prevalent subtype was the Luminal B, with
5 43.7% of cases in eutrophic patients and 38.4% in the overweight ones. Further, both groups
6 presented the majority of cases with tumor size between 2 and 5 cm, being 46.6% in eutrophic
7 and 48.7% in overweight ones.

8 The histological grade of the predominant breast tumors was the
9 intermediate, with 53.3% of the eutrophics and 42.8% of the overweighted women. The
10 absence of angiolymphatic emboli was observed in both groups, 61.5% eutrophic and 62.7%
11 in the overweight patients. Regarding their age at diagnosis, most of women were older than
12 50 years, with 64.7% of cases in eutrophic women and 75.0% of cases in overweight patients.
13 Both groups presented a high percentage of menopause, with 85.7% in the eutrophics and
14 74.3% in the overweighted ones, respectively.

15 In relation to the presence of lymphnodal metastasis, it was observed that
16 its prevalence was 53.8% in eutrophic women, and 51.4% for overweight women.

17

18 **Table 1 - Clinicopathological data of the patients included in the study.**

	Eutrophic (n=17)	Overweight (n=44)
Age at diagnosis		
Under 50 years	35,2%	25,0%
Over 50 years	64,7%	75,0%
Menopausal status		
Menopause – Yes	85,7%	74,3%
Menopause - No	14,2%	25,6%
Molecular subtyping		

Luminal A	18,7%	25,6%
Luminal B	43,7%	38,4%
HER2	25,0%	7,6%
Triple negative	12,5%	28,2%
Tumor size		
≤ 2 cm	46,6%	29,2%
2-5 cm	46,6%	48,7%
≥ 5 cm	6,6%	21,9%
Histological grade		
Grade 1	13,3%	23,8%
Grade 2	53,3%	42,8%
Grade 3	33,3%	33,3%
Angiolymphatic emboli		
Presence	38,4%	37,2%
Absence	61,5%	62,7%
Lymphnodal metastasis		
Yes	46,1%	51,4%
No	53,8%	48,5%

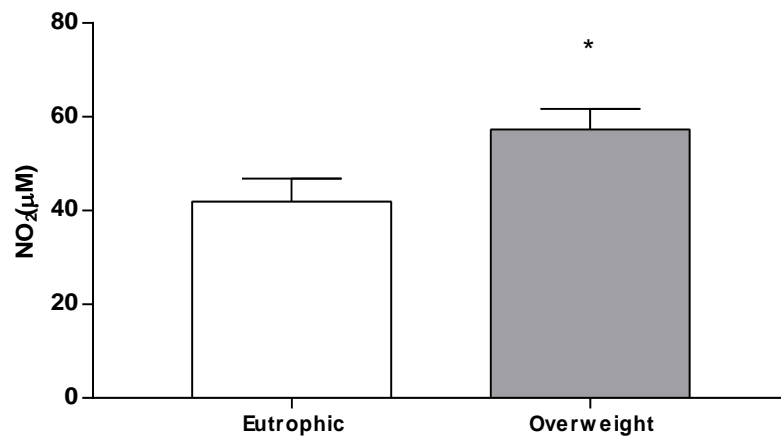
1 **Legend:** HER2 = Human epidermal growth factor receptor 2, n = number of individuals.

2

3 Figure 2 shows the comparative analysis of the estimative of NO[•] between eutrophic
 4 and overweight patients. A significant increase in NO[•] levels was observed in the
 5 overweighed ones, ranging from $41.9 \pm 4.9\mu\text{M}$ in the eutrophic group to $57.2 \pm 4.4\mu\text{M}$ in the
 6 overweight patients ($p = 0.052$).

7

8



1

2 **Figure 2 – Comparative analysis of plasmatic estimated NO[•] levels in eutrophic and**
 3 **overweight patients.** Data represents the mean ± standard error of the mean. * Indicates
 4 statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test.

5

6

7 Figure 3 shows the comparative analysis of NO[•] estimated levels among the
 8 different breast cancer subtypes categorized according to patients' BMI. One-way ANOVA,
 9 comparing all groups, revealed no significant differences (data not shown). When analyzing
 10 the groups concerning the specific BMI pairs, no differences were observed in both groups
 11 when bearing Luminal A tumors (Figure 3A, $48.3 \pm 9.3 \mu\text{M}$ for eutrophic and $51.9 \pm 4.5 \mu\text{M}$
 12 for overweight patients, $p = 0.7183$). Increased circulating levels were observed when
 13 comparing the patients with Luminal subtype B (Figure 3B, $29.1 \pm 7.7 \mu\text{M}$ for eutrophic
 14 patients and $67.3 \pm 10 \mu\text{M}$ for overweight patients, $p = 0.0353$). Patients with HER2-
 15 amplified (Figure 3C) and triple negative tumors (Figure 3D) did not show significant
 16 differences ($46.8 \pm 8.2 \mu\text{M}$ in eutrophic HER2 positive women, $48.9 \pm 13.4 \mu\text{M}$ in
 17 overweighted HER2 positive women, $p = 0.8955$; $39.8 \pm 14.3 \mu\text{M}$ in eutrophic women with
 18 triple negative tumors and $56.6 \pm 9 \mu\text{M}$ for triple negative overweight patients, $p = 0.4680$).

18

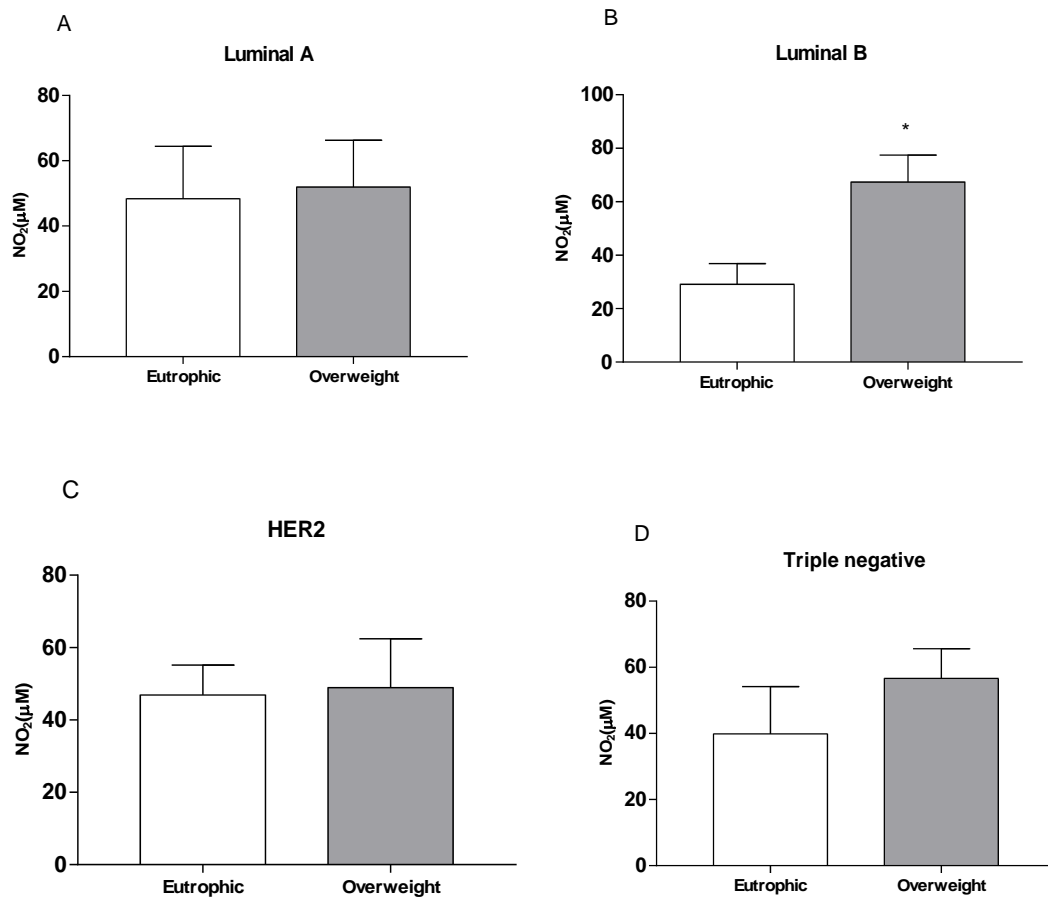


Figure 3 – Molecular subtypes of tumors and the estimative of plasmatic NO[•] in breast cancer women categorized according to their BMI. A – Patients bearing Luminal A tumors, B – patients bearing Luminal B tumors, C – patients bearing HER2-amplified tumors and D – patients bearing triple negative tumors. Data represent the mean ± standard error of the mean. * Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test.

As shown in Figure 4, a significant difference between estimated NO[•] levels in eutrophic ($39.4 \pm 4.9 \mu\text{M}$) and overweight patients ($57.1 \pm 5.4 \mu\text{M}$) was found when they were in menopause ($p = 0.055$). In women who were not in menopause, no meaningful differences were observed ($23.1 \pm 15.5 \mu\text{M}$ for eutrophic patients and $62.0 \pm 10.7 \mu\text{M}$ for overweight).

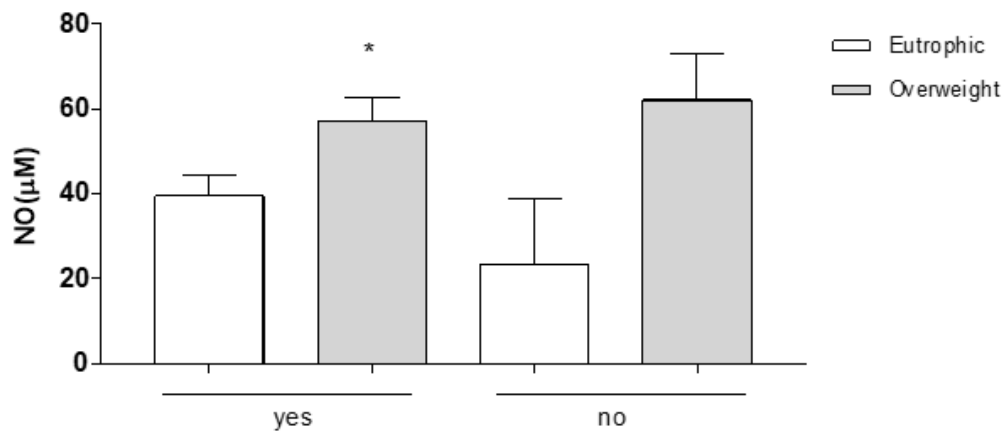
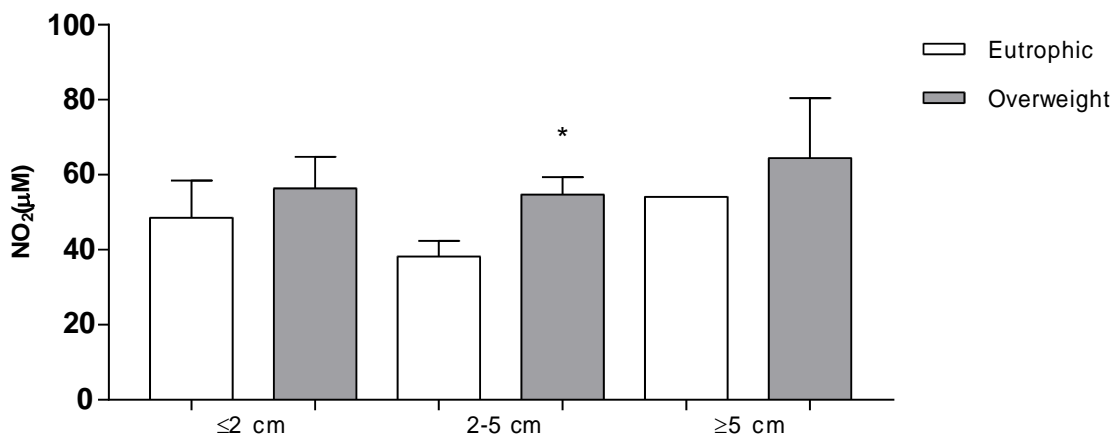


Figure 4 – Menopausal status and estimated NO' levels in eutrophic and overweight breast cancer patients. Data represent the mean \pm standard error of the mean. * Indicates statistically significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test.

In relation to tumor size (Figure 5), a significant difference was observed between patients with tumors ranging from 2 to 5 cm, where eutrophic women had lower levels of NO' when compared to the overweighted ones ($38.1 \pm 4.2 \mu\text{M}$ for eutrophic and $54.7 \pm 4.6 \mu\text{M}$ for overweight, $p = 0.056$). For the other size, no significant difference was observed ($48.5 \pm 9.9 \mu\text{M}$ in eutrophic women and $56.3 \pm 8.4 \mu\text{M}$ in the overweight group bearing tumors up to 2 cm, $p = 0.5677$, and $54.1 \mu\text{M}$ in the group of eutrophic patients (only 1 patient was included in this group), $64.4 \pm 16 \mu\text{M}$ for overweight group when the tumor size was larger than 5 cm, $p = 0.2108$).



1 **Figure 5 – Tumor size and estimated NO levels in eutrophic and overweight women with**
 2 **breast cancer.** Data represents the mean \pm standard error of the mean. * Indicates statistically
 3 significant difference ($p \leq 0.05$), Student t test.

4 Other characteristics were presented in Table 2 of the participants.

5 **Table 2 – Estimated NO' levels according to patients' age at diagnosis, intratumoral**
 6 **emboli, histological grade and lymphnodal invasion.**

7

	Eutrophic (n=17)	Overweight (n=44)	P value
Age at diagnosis	44.7 \pm 6.8 μ M	56.7 \pm 4.9 μ M	0.1604
(< 50 or >50 years)			
Emboli			
Yes	46.7 \pm 10.7	59.5 \pm 8.8	0.4585
No	48.5 \pm 5.0	56.4 \pm 5.1	0.4234
Grade			
1	20.1 \pm 12.5	52.2 \pm 11.5	0.2627
2	45.7 \pm 7.6	60.4 \pm 6.7	0.2085
3	51.1 \pm 4.5	58.3 \pm 7.5	0.5846
Lymphnodal invasion			
Positive	35.96 \pm 6.49	60.23 \pm 8.83	0.1419
Negative	46.30 \pm 6,63	51.81 \pm 3.85	0.4605

8

1 4 DISCUSSION

2 This study reports that patients with breast cancer and high BMI have
3 higher circulating NO[•] levels when compared to eutrophic patients. Further, we shown that if
4 considering specific clinicopathological features, it can result in distinct levels of circulating
5 NO[•] in breast cancer patients if considering their adipose-trophic levels. This information is
6 new, and adds to the literature regarding breast cancer and NO[•] biology.

7 Adipose tissue is an important endocrine organ producing cytokines and
8 inflammatory mediators that act as systemic regulators of both metabolic and immune
9 responses. Overweight causes the progressive increase of fat cells, generating tissue hypoxia
10 and the release of pro-inflammatory cytokines that are attractive to macrophages [13], which
11 infiltrate and increase the expression of pro-inflammatory enzymes like iNOS [14].
12 Therefore, this process can lead to increase in NO[•] production in a vicious cycle, sustained by
13 the inflammation caused due to the excessive fat present in overweighed women. In addition,
14 it must be considered the known dysregulation of the NO[•] axis that occurs in breast cancer
15 [7].

16 The growing advances in molecular biology became possible to understand
17 that breast cancer is a heterogeneous disease, in which the levels of inflammatory mediators
18 also vary according to the expression of genes and proteins that determine tumor prognosis
19 [15,16]. In the present study, it was observed that different subtypes of breast cancer may also
20 present variations of NO[•] levels according to the patients' trophic levels. Women with breast
21 cancer carrying Luminal B tumors presented higher NO[•] levels when they were overweight.
22 Luminal subtype B is described as one of the most aggressive forms of breast cancer, with
23 increased cell proliferation and high growth factor receptor expression [17]. Several
24 mechanisms have been proposed for the action of NO[•] as an important mediator of tumor
25 growth, such as angiogenesis regulation and metastasis process. NO[•] can further promote

1 tumor growth by stimulating prostaglandins production, altering the balance in arachidonic
2 acid metabolism that favors prostaglandin E2, resulting in increased vasodilation in the tumor
3 vasculature [5]. In this way, Luminal B tumors may take benefit from NO[•] produced by
4 excessive fat to further proliferate and invasion.

5 Proliferative breast tumors can quickly gain mass and increase the tumor
6 size. We demonstrated increased estimated NO[•] levels in women with tumors between 2-5 cm
7 that were overweight, suggesting a fat-proliferation-tumor size relationship. It is known that
8 breast tumors have an increase in iNOS expression in higher histological degrees, and tend to
9 be more invasive due to the genomic instability installed by the systemic stress [18]. In this
10 context, it is possible that the increased NO[•] reported here in the overweighed patients could
11 play a promoting role in tumor growth and spread by affecting tumor undifferentiating.

12 Another key factor in understanding the biology of breast tumors, is their
13 close relationship with the hormonal axis [19]. In the present study, estimated NO[•] levels in
14 postmenopausal patients were significantly higher in overweight women compared to the
15 eutrophic ones, suggesting an important crosstalk among breast cancer, NO[•] and the estrogen
16 axis. After menopause, the mammary gland undergoes several changes that lead to the
17 expansion of adipose tissue in the breast, which is seen as a functionally active endocrine
18 organ that plays an important role in defining the extracellular microenvironment for normal
19 and tumor-associated ductal epithelial cells. Mammary adipose tissue is responsible for
20 producing steroidal and peptide hormones, as well as hormone-like molecules known as
21 adipokines or adipocytokines [20].

22 Postmenopausal women with breast cancer and that are overweighed exhibit
23 excessive stimulation of estrogen production in adipose tissue by aromatizing androstendione
24 into estrone, followed by estradiol formation and increased aromatase activity [21]. This
25 estradiol axis overexpression is regulated by inflammatory mediators such as prostaglandin

1 E2, IL-6 and TNF- α , as well as by NO \cdot , which induce oxidative/nitrosative stress, inducing
2 NO \cdot synthesis, and result in genotoxic cell damage [22], further stimulating breast cell
3 proliferation [21]. Thus, we hypothesized that sustained NO \cdot production in the presence of
4 this local and systemic proinflammatory environment caused by excess fat in these
5 postmenopausal patients may represent a worse prognostic factor for disease progression,
6 potentiated by the possible extra-gonadal estrogen synthesis induced by NO \cdot axis.

7 The result of stimulating NO \cdot -induced cell proliferation in the pro-
8 inflammatory environment of the adipose breast should directly affect the size of the tumor
9 mass formed. In fact, the results of the present study demonstrate a direct relationship
10 between the estimated NO \cdot levels and tumor size in overweight patients. Increased levels of
11 estimated NO \cdot were found in overweight patients with tumors masses sized from 2 to 5 cm,
12 which could potentially favors the spread of tumor cells due to the significant number of
13 tumor cells. The literature discusses that tumor growth capacity is associated with NO \cdot
14 generated by iNOS in the mammary stroma, which promotes the formation of new blood
15 vessels through activation of VEGF- α . This tumor growth is eventually sustained by this
16 increased blood flow mediated by prolonged and excessive NO \cdot production in the tumor [23].

17 The study presented some limitations including the sample size, lack of NO \cdot
18 estimative in tumor mammary tissue and the lack of evaluation of other NO \cdot axis components.
19 On the other hand, some extremely positive points of the study include the fact that the
20 patients had not any previous chemotherapy before sample collection, and that their disease
21 was staged specifically in the TNM II (early disease).

1 5 CONCLUSION

2 Based on the results, it can be concluded that excessive body weight directly
3 influences the levels of NO[•], and consequently affects the prognosis of breast cancer because
4 it correlates with important poor prognosis factors as Luminal B subtypes, formation of larger
5 tumor masses and a putative association with estrogen axis.

6 Considering that excessive body weight is a public health problem
7 worldwide, this study allowed to understand the relationship between circulating NO[•] and
8 overweight in the context of the main prognostic factors of breast cancer.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

ABBREVIATION LIST

- 1
- 2
- 3 **NO[•]**: Nitric oxide
- 4 **•ONOO⁻**: Peroxynitrite
- 5 **CONEP**: National Ethics and Research Commission
- 6 **UNIOESTE**: State University of Western Paraná
- 7 **CAAE**: Presentation Certificate for Ethical Appreciation
- 8 **CEONC**: Francisco Beltrão Cancer Hospital
- 9 **ICB**: Infiltrating Carcinoma of the Breast
- 10 **BMI**: Body mass index
- 11 **OMS**: World Health Organization
- 12 **TNM**: Size-nodule metastasis
- 13 **ER**: Estrogen receptor
- 14 **PR**: Progesterone receptor
- 15 **HER2**: Human Epidermal Growth Factor 2 Receptor
- 16 **Ki-67**: Proliferative Index
- 17 **ZnSO₄**: Zinc Sulphate
- 18 **NaOH**: Sodium hydroxide
- 19
- 20 **CuSO₄**: Copper Sulphate
- 21 **H₂O**: Water
- 22 **Lum A**: Luminal A
- 23 **Lum B**: Luminal B
- 24 **iNOS**: Inducible nitric oxide synthase
- 25 **IL-6**: Interleukin-6
- 26 **TNF- α** : Tumor necrosis factor-alpha
- 27 **VEGF- α** : Vascular endothelial growth factor alpha

REFERENCES

1

- 2 [1] INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de mama.
3 <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acessado em: 17/06/2019.
- 4 [2] ZIMTA, A. A. et al. Molecular links between central obesity and breast cancer. *Int. J.*
5 *Mol. Sci.* 2019; 20 (21).
- 6 [3] ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev. Med.* 2012;
7 89 (1): 21-31.
- 8 [4] KHANNA, R. et al. Inflammation, Free Radical Damage, Oxidative Stress and Cancer.
9 *Interdiscip J Microinflammation.* 2014; 1 (1): 1-5.
- 10 [5] WINK, D. A. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis.* 1998;
11 19 (5): 711–21.
- 12 [6] BROWN, N. S.; BICKNELL, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer Oxidative
13 stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer.
14 *Breast Cancer Research.* 2001; 3: 323–7.
- 15 [7] PANIS, C. et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and
16 advanced stages of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133 (3): 881-8.
- 17 [8] STOLARCZYK, E. Adipose tissue inflammation in obesity: A metabolic or immune
18 response? *Current Opinion in Pharmacology.* 2017; 37: 35–40.
- 19 [9] INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A. DA; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de
20 proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. *Cad. Saúde Pública.* 2011; 27 (7):
21 1259-1270.
- 22 [10] SANSBURY, B. E.; HILL, B. G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric
23 oxide. *Free Radic Biol Med.* 2014; 73: 383-99.
- 24 [11] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Câncer de mama: sintomas, tratamentos, causas e
25 prevenção. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-mama#sintomas>. Acessado em:
26 17/06/2019.
- 27 [12] GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer:
28 highlights of the St Gallen Internacional Expert Consensus on the primary therapy of early
29 breast cancer 2013. *Annals of Oncology.* 2013; 24: 2206-23.
- 30 [13] CARVALHO, D.; FREITAS, P. 10 perguntas sobre inflamação e diabetes. 2018.
31 <https://www.researchgate.net/publication/323692324>. Acessado em 28 de Agosto de 2019.
- 32 [14] SANSBURY, B. E.; HILL, B. G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric
33 oxide. *Free Rad and med.* 2014; 73: 383-99.

- 1 [15] HERRERA, A. C. Molecular subtypes is determinant on inflammatory status and
2 immunological profile from invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol Immun.* 2012;
3 61 (11): 2193-201.
- 4 [16] CORREA, S. et al. Identifying potential markers in breast câncer subtypes using plasma
5 label-free proteomics. *J. Proteomics.* 2016; 151: 33-42.
- 6 [17] CREIGHTON, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Bio Targ and*
7 *Therapy.* 2012: 289-97.
- 8 [18] JENKINS, D. C. et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;
9 92: 4392-6.
- 10 [19] PARL, F. F. et al. Genomic-epidemiologic evidence that estrogens promote breast cancer
11 development. *Amer Assoc for Cancer Res.* 2012; 27 (8): 899-907.
- 12 [20] DASHTI, S. G. et al. Adiposity and estrogen receptor-positive, postmenopausal breast
13 cancer risk: quantification of the mediating effects of fasting insulin and free estradiol. *Inter*
14 *Jour of Cancer.* 2019.
- 15 [21] BHARDWAJ, P. et al. Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-
16 related development, growth and progression. *Jour of Steroid Biochem & Mol Biol.* 2019.
- 17 [22] BERSTEIN, L. M. et al. Signs of proinflammatory/genotoxic switch
18 (adipogenotoxicosis) in mammary fat of breast cancer patients: role of menopausal status,
19 estrogens and hyperglycemia. *Int J Cancer.* 2007; 121: 514-9.

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

- 1 nas neoplasias. **Ciência Rural**. p. 967–974, 2003.
- 2 COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 420, December,
3 2002.
- 4 DIECI, M. V. et al. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and
5 Clinical Peculiarities. **The oncologist**. v. 19, p. 805–813, 2014.
- 6 DUSSE, L. M. S. Óxido nítrico (NO[•]): o desafio de sua determinação. **Laes & Haes**.
7 n.1, p. 176-184, 1998.
- 8 FILIPPIN, L. I. et al. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da
9 Artrite Reumatóide Redox Influence on the Inflammatory Response in Rheumatoid
10 Arthritis. **Rev. Bras. Reumatol**. v. 48, n. 1, p. 17–24, 2008.
- 11 GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova
12 classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de**
13 **Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 463–474, 2012.
- 14 GRENFELL, A. M. G.; ANGÉLICA, V.; MARTHA, P. Óxido nítrico, estrés nitrosante y
15 función mitocondrial. **Rev. End. y Nutrición**. v. 14, n. 4, 2006.
- 16 GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast
17 cancer: highlights of the St Gallen Internacional Expert Consensus on the primary
18 therapy of early breast cancer 2013. **Annals of Oncology**. v. 24, p. 2206-2223,
19 2013.
- 20 HEINECKE, J. L. et al. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of
21 NOS2 in breast cancer progression. **PNAS**. v. 111, n. 17, p. 6323-6328, 2014.
- 22 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de mama**. Disponível em:
23 <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>. Acesso em:
24 17/06/2019.
- 25 INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A. DA; NAVES, M. M. V. Fatores de risco e de
26 proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática. **Cad. Saúde Pública**. v.
27 27, n. 7, p. 1259-1270, 2011.
- 28 JONES, A. M. Dietary nitrate supplementation and exercise performance. **Sports**
29 **Med**. v. 44, p. 35-45, 2014.
- 30 KHANNA, H. D. et al. Inflammation, Free Radical Damage, Oxidative Stress and
31 Cancer. **Interdiscip J Microinflammation**. v. 1, n. 1, p. 1-5, 2014.
- 32 KELSEY, J. L.; GAMMON, M. D.; JOHN, E. M. Reproductive Factors and Breast
33 Cancer. **Epidemiologic Reviews**. v. 15, n. 1, p. 36–47, 1993.
- 34 KIECHLE, F. L.; MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and

- 1 detection. **Am. J. Clon. Pathol.** n. 100, p. 567-675, 1993.
- 2 MEYER, J. S. et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom – Richardson
3 system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation
4 index. **Modern Pathology**. v. 18, p. 1067–1078, 2005.
- 5 MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Câncer de mama: sintomas, tratamentos, causas e**
6 **prevenção**. Disponível em: <[http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-](http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-mama#sintomas)
7 [mama#sintomas](http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-mama#sintomas)>. Acesso em: 17/06/2019.
- 8 MUNGRUE, I. N. et al. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?
9 **Acta Physiologica**. 2003.
- 10 NATHAN, C.; XIE, Q-W. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. **Cell**. v. 78,
11 p. 915-918, 1994.
- 12 ONCOGUIA. **Sinais e sintomas do câncer de mama**. Disponível em:
13 <[http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-](http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-mama/1383/34/)
14 [mama/1383/34/](http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-mama/1383/34/)>. Acesso em: 17/06/2019.
- 15 ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev. Med.** n.
16 89, v. 1, p. 21-31, 2010.
- 17 PALMER, M. A. S. et al. SEOM clinical guidelines in advanced and recurrent breast
18 cancer. **Clinical and Translational Oncology**. v. 21, n. 1, p. 31–45, 2019.
- 19 PANIS, C. et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early
20 and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** v. 133, p.
21 881-888, 2012.
- 22 PARL, F. F. et al. Genomic-epidemiologic evidence that estrogens promote breast
23 cancer development. **Amer Assoc for Cancer Res.** n. 27, v. 8, p. 899-907, 2018.
- 24 PHILIPPU, A. Nitric oxide: a universal modulator of brain function. **Curr. Med. Chem.**
25 23, 2643-2652, 2016.
- 26 RIDNOUR, L. A. et al. Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-
27 mediated Akt activation. **PLOS ONE**. n. 7, 2012.
- 28 ROSE, D. P.; VONA-DAVIS, L. Review Article Biochemical and molecular
29 mechanisms for the association between obesity, chronic Inflammation, and breast
30 cancer. p. 1–12, 2013.
- 31 SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama : procurando o
32 luminal A. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 36, n. 12, p. 575–580, 2014.
- 33 SOUZA, G. T. DE. A relação de sobrevivência dos pacientes e os principais subtipos de
34 câncer de mama. **Cong Bras de Cienc da Saúde**. v. 1, n. 83, 2016.

- 1 STOLARCZYK, E. Adipose tissue inflammation in obesity: A metabolic or immune
2 response? **Current Opinion in Pharmacology**. v. 37, p. 35–40, 2017.
- 3 TEIXEIRA, A. K. S.; VASCONCELOS, J. L. A. Perfil histopatológico de pacientes
4 com diagnóstico de tumores malignos assistidos em um hospital de referência do
5 Agreste Pernambucano. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 55, n. 1, p. 87-97, 2019.
- 6 THOMAS, D. D. et al. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology.
7 **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, n. 301, p. 204–225, 2015.
- 8 THOMSEN, L. L. et al. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **British**
9 **Journal of Cancer**. n. 72, p. 41-44, 1995.
- 10 VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer
11 de mama BRCA. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, n. 4, p. 325–330,
12 2005.
- 13 WAJCHENBERG, B. L. Tecido Adiposo como Glândula Endócrina. **Arq. Bras. End.**
14 **Metab.** v. 44, n. 1, 2000.
- 15 WINK, D. A. et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**. v.
16 19, n. 5, p. 711–721, 1998.
- 17 YANG, R. et al. Prognostic value of Systemic immune-inflammation index in cancer:
18 A meta-analysis. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 18, p. 3295–3302, 2018.
- 19 ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: beyond
20 eNOS. **J. Pharmacol. Sci.** 129, 83-94, 2015.
- 21

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 O presente trabalho permitiu estimar os níveis de NO^{*} a partir da
4 dosagem de nitrito plasmático em pacientes portadores de câncer de mama com
5 diferentes apresentações clínicas. Observou-se que variações significantes em tais
6 níveis podem estar intimamente associadas à parâmetros clínicos importantes para
7 o prognóstico do câncer de mama, especialmente os níveis trófico-adiposos das
8 pacientes. Estes achados trazem novas informações, indicadoras de que o excesso
9 de peso corporal afeta diretamente a dinâmica do eixo NO^{*}, um importante e
10 conhecido mediador envolvido na promoção e progressão do câncer de mama.

1
2**ANEXOS****ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ/**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35524814.4.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 810.501

Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto:

Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional à agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos, metodológicos e éticos.

Objetivo da Pesquisa:

Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante para a área de oncologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados.

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Município: CASCAVEL

CEP: 85.819-110

Telefone: (45)3220-3272

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

3

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ/



Continuação do Parecer: 810.501

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado. O projeto não necessita adequações.

CASCADEL, 29 de Setembro de 2014

Assinado por:
João Fernando Christofolletti
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Telefone: (45)3220-3272

Município: CASCADEL

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

Research articles

Criteria

Research articles should report on original primary research.

Breast Cancer Research strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the article rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's [information on recommended repositories](#). Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the [Editorial Policies Page](#).

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names and institutional addresses for all authors
 - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the [CONSORT](#) extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials

- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in *BMC Research Notes*, you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Co-published data notes will be linked to the research article the data support ([example](#)).

For more information please email our [Research Data Team](#).

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological

examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

References

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>.

Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness.* 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia,* Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Figures, tables and additional files

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.

Additional criteria

The journal does not accept single gene association studies without a replication set and/or accompanying functional studies. Likewise, we do not accept studies where all or a substantive part of the data has been derived from a single breast cancer cell line. Studies should be replicated in at least one other cell line representative of the breast cancer subtype of interest.

[Submit manuscript](#)

[Submit manuscript](#)

- [Editorial Board](#)
- [Sign up for article alerts and news from this journal](#)

Follow

- [Follow us on Twitter](#) 

Annual Journal Metrics

- **Speed**
 - 81 days to first decision for reviewed manuscripts only
 - 46 days to first decision for all manuscripts
 - 170 days from submission to acceptance
 - 34 days from acceptance to publication

Citation Impact

5.676 - [2-year Impact Factor](#)
 6.302 - [5-year Impact Factor](#)
 1.77 - [Source Normalized Impact per Paper \(SNIP\)](#)
 2.874 - [SCImago Journal Rank \(SJR\)](#)

Usage

1,837,553 Downloads
 688 Altmetric Mentions

- [More about our metrics](#)

Advertisement