GABRIELA BOUFELLI DE FREITAS

**Proteína de choque térmico 70 quilodaltons
(HSP70) e carcinoma mamário**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Iara Moreno Linhares

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Freitas, Gabriela Boufélli de
Proteína de choque térmico 70 quilodaltons
(HSP70) e carcinoma mamário / Gabriela Boufélli de
Freitas. -- São Paulo, 2020.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Iara Moreno Linhares.

Descritores: 1.Proteínas de choque térmico
2.Carcinogênese 3.Neoplasias da mama 4.Apoptose
5.Divisão celular

USP/FM/DBD-262/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A meus pais, grandes exemplos. Obrigada por toda a dedicação, carinho e amor. Obrigada por toda minha formação, tanto pessoal como profissional, vocês são os pilares que sustentaram todo meu crescimento!

A meu marido **Guilherme**, meu companheiro. Obrigada por transformar em seus os meus sonhos, por me apoiar e incentivar sempre. A meus **filhos**, por me mostrarem um amor verdadeiro que me incentiva a ser uma pessoa melhor.

A nossa grande **família**, minha e do Guilherme, por toda a presença, incentivo e parceria sempre. Agradeço por dividirem comigo todos os momentos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, Professor Titular de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo estímulo a minha formação profissional e por todas as oportunidades concedidas.

À Profa. Dra. Iara Moreno Linhares, por toda dedicação e paciência com seus alunos, por sempre estar presente, ensinando e motivando. Minha eterna gratidão pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Ao **Programa Ciências sem Fronteiras da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio no financiamento
do projeto.

Ao **Prof. Dr. Jose Roberto Filassi**, pelas oportunidades e por todos os ensinamentos durante estes anos, por ter sempre me incentivado ao longo de minha carreira.

Ao **Prof. Dr. Steven S. Witkin**, por todo o conhecimento compartilhado, incentivo pela pesquisa e oportunidade de participar deste estudo.

Ao **Prof. Dr. Maurício Simões Abrão, Prof. Dr. José Roberto Morales Piato e Prof. Dr. José Maria Soares Junior**, pela valiosa apreciação desta pesquisa quando apresentada para exame de Qualificação.

A todos os **docentes e assistentes do Setor de Mastologia da Disciplina de Ginecologia**, pelo apoio e incentivo na realização deste estudo e pelos ensinamentos e parceria em todos estes anos.

À **Profa. Katia C. Carvalho**, pesquisadora do LIM58 por todos os ensinamentos e auxílio nas amostras.

Aos **pesquisadores e funcionários** do LIM58, por toda a colaboração e aprendizado.

Às **residentes e preceptoras** do Setor de Mastologia, por toda a ajuda na realização deste estudo.

Ao **Dr. Sergio Mitsuo Masili-Oku**, pela confiança, amizade e todos os ensinamentos.

Aos queridos amigos **Laura Penteado, Mila M. Miranda, Juliana Pierobon Gomes e Jonathan Y. Maesaka**, por estarem a meu lado, apoiando e colaborando na realização desta pesquisa.

A todos os **colaboradores** e à **equipe de enfermagem** do Setor de Mastologia – Instituto do Câncer e Hospital das Clínicas, pela disponibilidade e ajuda prestimosas.

À secretária da Pós Graduação, **Sra. Lucinda Cristina Pereira**, pela atenção, auxílio e todo o cuidado que foi necessário para o desenvolvimento deste estudo.

A todas as **pacientes**, razão deste estudo, minha profunda gratidão.

*"A dúvida é o princípio da sabedoria e
onde encontramos ideias."*

Aristóteles

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Fredd, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Araújo, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª ed. São Paulo. Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviação dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras e gráficos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia do câncer de mama.....	2
1.2 Proteínas de choque térmico	5
1.3 Proteínas de choque térmico e carcinogênese	7
1.4 Mensurações das proteínas de choque térmico	10
1.5 Proteínas de choque térmico e câncer de mama	12
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MÉTODOS	20
3.1 Desenho do estudo.....	21
3.2 Sujeitos	21
3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão dos grupos estudo e controle	22
3.3 Método de estudo	23
3.4 Cálculo amostral	25
3.5 Recursos financeiros	25
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
5 RESULTADOS	28
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÕES	51
8 ANEXOS	53
8.1 Termo de Consentimento Livre Esclarecido Hospital das Clínicas .	54
8.2 Termo de Consentimento Livre Esclarecido ICESP	57
8.3 Aprovação pelo Comitê de Ética	60
REFERÊNCIAS.....	62

Listas

ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Caspases	<i>Cysteine Dependente Aspartate Specific Proteases</i>
DP	Desvio Padrão
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2</i>
HIF1 alfa	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSF1	Fator de Transcrição 1 da Proteína de Choque
HSP	Proteína de Choque Térmico
HSPs	Proteínas de Choque Térmico
IC	Intervalo de Confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IMC	Índice de Massa Corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Quilodalton
LIM58	Laboratório de Ginecologia Molecular e Estrutural

MLG	Modelo Linear Generalizado
OMS	Organização Mundial da Saúde
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
RR	Risco Relativo
SBM	Sociedade Brasileira de Mastologia
<i>SEER</i>	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Tamanho do tumor, acometimento linfonodal e presença de metástase
TH	Terapia Hormonal

TABELAS

Tabela 1 -	Características sociodemográficas dos grupos controle (mulheres sem câncer de mama) e estudo (mulheres com câncer de mama)	29
Tabela 2 -	Índice de massa corpórea, antecedentes pessoais, antecedentes familiares e tabagismo nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama).	32
Tabela 3 -	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)	33
Tabela 4 -	Achados mamográficos presentes nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)	35
Tabela 5 -	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica em mulheres com câncer de mama, segundo raça, antecedentes ginecológicos, terapêutica hormonal, antecedentes pessoais, familiares e tabagismo.....	37
Tabela 6 -	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica em mulheres com câncer de mama, segundo estadiamento clínico e achados de exames de imagem	38
Tabela 7 -	Proteína de choque térmico 70kDa (HSP70) sérica em mulheres com câncer de mama, segundo os achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos	40
Tabela 8 -	Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica nas mulheres com câncer de mama invasivo, de acordo com o tamanho do tumor	42

GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1 -	Estimativa de incidência e mortalidade por câncer em mulheres para 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	2
Gráfico 2 -	Estimativa de incidência de câncer em mulheres no mundo em 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	3
Gráfico 3 -	Estimativa de mortalidade por câncer em mulheres no mundo em 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde.....	3
Gráfico 4 -	Distribuição por raça entre os grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama).....	30
Gráfico 5 -	Distribuição da escolaridade nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem a neoplasia)	31
Gráfico 6 -	Distribuição dos níveis séricos da HSP70 nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)	34
Figura 1 -	Ativação do HSF1 por injúria à célula, resultando no aumento da produção das HSPs	9
Figura 2 -	Atuação das HSPs nas vias de apoptose e senescência	10

Resumo

Boufelli G. *Proteína de choque térmico 70 quilodaltons (HSP70) e carcinoma mamário* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: O número de mulheres acometidas por câncer de mama vem crescendo ao longo dos anos, sendo importante o diagnóstico precoce para melhor prognóstico e maior sobrevida destas pacientes. As proteínas de choque térmico (HSPs) estão presentes em todas as células e, em condições fisiológicas atuam na estabilização proteica e na degradação de proteínas alteradas, sendo responsáveis pela homeostase celular, controle do ciclo celular e apoptose. Entretanto, quando a célula sofre uma situação de estresse, pode haver superexpressão destas proteínas, possibilitando que danos proteicos não sejam reparados, a apoptose seja inibida e a divisão celular ocorra de modo irregular. Esta divisão desordenada pode levar ao aparecimento de doenças, dentre as quais o câncer. Alguns estudos demonstraram aumento da HSP70 em pacientes com câncer de mama. **Objetivos:** Avaliar o nível sérico da HSP70 em mulheres com câncer de mama, comparativamente a mulheres sem essa neoplasia. Adicionalmente, correlacionar o nível sérico da HSP70 com características tumorais como subtipo histológico, presença de receptores hormonais e HER2, grau histológico, estadiamento, grau nuclear, índice de proliferação celular (KI67) e presença de invasão linfática ou de vasos. **Métodos:** Estudo transversal analítico, caso controle, realizado no Setor de Mastologia da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP. No período de setembro de 2017 a dezembro de 2018, foram incluídas 62 mulheres com câncer de mama (grupo estudo) que compareceram a primeira consulta e 59 mulheres sem essa neoplasia (grupo controle). Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram coletados 10ml de sangue de cada participante; as amostras foram centrifugadas e o soro coletado, armazenado a - 80°C e posteriormente testado para as concentrações de HSP70 por meio de testes comerciais ELISA, de acordo com as instruções do fabricante *Elabscience®* (Houston, Texas, USA). Os dados epidemiológicos e clínicos foram obtidos por meio de consulta aos prontuários eletrônicos. **Resultados:** As médias etárias nos grupos de estudo e controle foram 54,3 e 52 anos, respectivamente. Os valores séricos da HSP70 verificados em mulheres com câncer de mama foram superiores aos encontrados em mulheres sem a doença (média 1214,3pg/ml versus 419,5pg/ml) ($p < 0,001$). Com relação as características tumorais, observou-se tendência de elevação da HSP70 nos tumores localmente avançados comparativamente aos menos avançados, nos tumores com grau histológico 3, e nos com maior índice de proliferação celular (KI67), embora as diferenças entre os subgrupos não fossem estatisticamente significativas. O valor sérico da HSP70 foi semelhante aos diferentes subtipos histológicos, diferentes graus nucleares, presença ou ausência de receptores tumorais e presença ou ausência de invasão angiolinfática. **Conclusão:** Na amostra estudada a proteína de choque térmico HSP70 sérica encontrou-se elevada nas pacientes com câncer de mama, comparativamente a mulheres sem essa neoplasia. Com relação as características tumorais, não foram detectadas

correlações entre os níveis séricos de HSP 70 e os diferentes subtipos histológicos, presença de receptores hormonais e HER2, grau nuclear e presença de invasão angiolinfática. Foi observada tendência de elevação nos valores séricos da HSP70, com aumento do grau histológico do tumor, o estadiamento mais avançado e maior índice de proliferação celular, embora os valores encontrados para os diferentes subgrupos não mostrassem diferenças estatisticamente significativas. Assim, novos estudos sobre o papel da HSP70 sérica no carcinoma mamário poderão contribuir para a possível utilização no diagnóstico e tratamento do câncer de mama.

Descritores: Proteínas de choque térmico; Carcinogênese; Câncer de mama; Apoptose; Divisão celular; HSP70.

Abstract

Boufelli G. *Heat shock protein 70 kilodaltons (HSP70) and breast carcinoma* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Introduction: The number of women affected by breast cancer has been growing over the years, early diagnosis is important for a better prognosis and longer survival of these patients. Heat shock proteins (HSPs) are present in all cells. They promote protein stabilization and degradation of altered proteins, contribute to cell homeostasis, cell cycle regulation and apoptosis under physiological conditions. However, when the cell undergoes a stressful situation, there is overexpression of HSPs, possibly changing its intracellular functions. Apoptosis is inhibited and the rate of cell division can be altered. An unregulated cellular proliferation can lead to the onset of diseases, including cancer. **Objectives:** Evaluate the serum level of HSP70 in women with breast cancer, compared to women without this neoplasm. Additionally, correlate the serum level of HSP70 with tumor characteristics such as histological subtype, the presence of hormonal receptors and HER2, histological grade, staging, nuclear grade, cell proliferation index (KI67) and the presence of lymphatic or vessel invasion. **Methods:** This was a cross-sectional analytical, case-control study, carried out at the Mastology Sector of the Gynecology Division of the Department of Obstetrics and Gynecology at FMUSP. From September 2017 to December 2018, 62 women with breast cancer (study group), seen for the first time, and 59 women without this neoplasm (control group) were included. After signing the consent form, each participant had 10 ml of blood sample collected. The samples were centrifuged and the serum fraction was collected and stored at -80°C until tested for HSP70 concentrations using a commercial ELISA test (Elabscience, Houston, Texas, USA). Epidemiological and clinical data were obtained by consulting electronic medical records. **Results:** The mean ages in the study and control groups were 54.3 and 52 years, respectively. The serum values of HSP70 found in women with breast cancer were higher than those found in women without this disease (mean 1214.3 pg/ml versus 419.5 pg/ml) ($p < 0.001$). Regarding tumor characteristics, there was a tendency towards an increase in HSP70 in locally advanced tumors compared to less advanced tumors, in tumors with histological grade 3, and in those with the highest cell proliferation index (KI67). However, differences in values between the subgroups were not statistically significant. The serum level of HSP70 was unrelated to histological subtypes, nuclear degree, hormonal receptors and HER2 status and the presence or absence of angiolymphatic invasion. **Conclusion:** In the population studied, the serum HSP70 was elevated in patients with breast cancer, compared to women without this

neoplasm. Regarding tumor characteristics, no correlations were found between the serum levels of HSP70 and the different histological subtypes, presence of hormone receptors and HER2, nuclear grade and presence of angiolymphatic invasion. There was a tendency towards an increase in serum HSP70 values with an increase in the tumor's histological grade, with more advanced staging and a higher rate of cell proliferation. Further studies about the role of serum HSP70 in breast carcinoma may contribute to its possible use in breast cancer diagnosis and treatment.

Descriptors: Heat shock proteins; Carcinogenesis; Breast cancer; Apoptosis; Cell division; HSP70.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O número de pacientes com diagnóstico de câncer vem crescendo no mundo, atualmente esta doença é a segunda causa de morte em mulheres; a primeira causa é representada pelas doenças cardiovasculares ⁽¹⁾. A estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) para 2018 era a incidência de 8.622.539 novos casos de câncer em mulheres e mortalidade de 4.169.387 casos; dentre estes, 2.088.849 novos casos de neoplasia maligna de mama com mortalidade de 626.679 casos ⁽²⁾. Os Gráficos 1, 2 e 3 ilustram esses dados.

Fonte: Globocan 2020.

Gráfico 1 - Estimativa de incidência e mortalidade por câncer em mulheres para 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde

Fonte: Globocan 2020.

Gráfico 2 - Estimativa de incidência de câncer em mulheres no mundo, em 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde

Fonte: Globocan 2020.

Gráfico 3 - Estimativa de mortalidade por câncer em mulheres no mundo, em 2018, segundo a Organização Mundial de Saúde

Nos Estados Unidos, o câncer de mama também é o mais diagnosticado em mulheres, depois do câncer de pele não melanoma. Corresponde à segunda causa de morte por neoplasias malignas, ficando atrás apenas do câncer de pulmão ⁽³⁾.

Conforme levantamento realizado pela Sociedade Americana de Câncer utilizando a base de dados do “*Surveillance, Epidemiology, and End Results*” (SEER), uma mulher vivendo nos Estados Unidos tem 12,3% de chance de ter câncer de mama invasivo ao longo da vida (*lifetime risk*), ou seja, uma em cada oito mulheres terão este diagnóstico ⁽³⁾. Em 1970, a chance de ter câncer de mama era 9%, ou seja, uma para 11 mulheres; o aumento, ao longo dos anos, deve-se, provavelmente, à elevação na expectativa de vida, somado ao fato de as mulheres engravidarem mais tarde e terem número menor de filhos ⁽³⁾.

No Brasil, de modo semelhante, a neoplasia maligna de mama também é a mais frequente entre as mulheres, depois do câncer de pele não melanoma, correspondendo a, aproximadamente, 28% dos casos novos a cada ano. A estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), para 2020, era de 316.280 casos novos de câncer em mulheres, com mortalidade de 107.235 casos, sendo o de mama responsável por 66.280 novos casos e 17.572 mortes ⁽⁴⁾.

O câncer de mama, portanto, é uma doença que acomete grande número de mulheres por ano, afetando sua qualidade de vida, as quais serão submetidas a tratamentos complexos e, muitas vezes, dispendiosos. Quanto mais precoce o diagnóstico maior a chance de cura e menor o impacto no dia a dia da paciente e nos custos envolvidos no tratamento. Por ser uma doença cujo diagnóstico precoce aumenta a sobrevida global da paciente, o rastreamento deve ser incentivado ⁽²⁾.

A OMS recomenda realizar mamografia bianual entre 50 e 69 anos, pois nesta faixa etária, o rastreamento pode resultar na redução entre 20% e 30% na mortalidade pelo câncer de mama. Em países com poucos recursos financeiros, onde a realização da mamografia não é acessível à maior parte

da população, a orientação é incentivar a realização de anamnese e exame físico por profissional da saúde treinado de forma regular, buscando realizar diagnósticos precoces ⁽⁵⁾. A Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) recomenda que a mamografia seja anual a partir dos 40 anos, embora as mamas sejam mais densas, com a possibilidade de maior número de resultados falsos positivos e falsos negativos. Nesta faixa etária, é necessário rastrear 1.904 mulheres para se evitar uma morte pelo câncer de mama, e, entre 50 e 59 anos são necessárias 1.339 mamografias para se evitar uma morte, de acordo com estimativas da *U. S. Preventive Services Task Force*. Assim, a SBM justifica estender o rastreio às pacientes entre 40 e 50 anos no Brasil, pois o diagnóstico de câncer de mama em mulheres abaixo dos 50 anos pode chegar a 40% dos casos em nosso país e o rastreio nesta faixa etária pode reduzir em 23% a mortalidade ⁽⁶⁻⁸⁾.

1.2 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

As proteínas de choque térmico (HSPs) são produzidas por diversos genes e necessárias à sobrevivência das células em situações de estresse ⁽⁹⁾. Foram descobertas em 1962 por Ferruccio Ritossa e colaboradores ⁽¹⁰⁾, que observaram que o choque térmico induzia a expressão de alguns cromossomos nas glândulas salivares das larvas de *Drosophila melanogaster*. Mas, apenas, em 1974, foram identificados os primeiros produtos destes genes, sendo escolhido, então, o termo “proteínas de choque térmico” às proteínas que resultavam da expressão dos genes ativados pelo aumento de temperatura ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

As HSPs estão presentes em todas as espécies eucarióticas e procarióticas, incluindo as plantas. Localizam-se em vários compartimentos intracelulares e, em condições fisiológicas, agem na estabilização e na translocação proteica, assim como na degradação de proteínas alteradas. Normalmente, as HSPs são expressas nas células, totalizando entre 5% e 10% do conteúdo proteico celular em condições ótimas, mas as

concentrações podem aumentar cerca de duas ou três vezes quando tais proteínas são induzidas por agressões que resultam em danos proteicos ⁽¹⁰⁻¹³⁾.

A expressão das HSPs nas células não pode ser excessiva, já que sua presença de forma aumentada pode afetar de modo negativo a homeostase proteica e as funções intracelulares, alterando o crescimento celular e o processo de apoptose. Diversos tipos de estresse induzem a expressão da família de genes das HSPs, como: calor, anoxia, isquemia, nicotina, metais pesados e etanol, entre outros. Assim, o termo mais adequado seria “proteínas de estresse” ⁽¹⁴⁾. As HSPs são importantes no processo de arranjo tridimensional das proteínas produzidas nas células e também auxiliam no reparo das proteínas desnaturadas ou promovem sua degradação, em caso de dano irreparável ^(14, 15).

As HSPs pertencem a uma família de origem multigênica e são classificadas em seis famílias conforme o peso molecular: HSPs grandes (HSP110), HSP 90kDa (HSP90), HSP 70kDa (HSP70), HSP 60kDa (HSP60), HSP 40kDa (HSP40) e HSPs pequenas (HSP27). A evolução celular e molecular de variados organismos dependeu em parte das HSPs, visto que estas promovem a adaptação celular às condições de estresse, tendo como objetivo manter a conformação espacial proteica adequada ^(9, 16).

As HSPs são divididas em dois grandes grupos, as que participam do dobramento de proteínas e as que trabalham no desdobramento de proteínas. No primeiro grupo estão as HSP40, HSP70, HSP90 e no segundo as HSP27, HSP60 e HSP110 ^(9, 17, 18).

Além das funções acima, as HSPs também apresentam funções de controle do metabolismo celular. As HSP90 participam dos processos de mitoses e ciclo celular e as HSP27 e HSP70 são encarregadas dos processos de morte celular programada ⁽⁹⁾.

Quando a célula é submetida a um estresse, os processos de dobramento e desdobramento de proteínas e os mecanismos de controle de mitoses e morte celular ficam alterados; ocorre superexpressão das HSPs, o

processo de reparo celular não acontece e a célula divide-se de modo irregular. Níveis anormais de HSPs foram encontrados em diversas doenças como aterosclerose, insuficiência cardíaca congestiva, doença de Alzheimer, câncer e doenças autoimunes ^(9, 18).

1.3 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E CARCINOGENESE

Os passos para o desenvolvimento de uma lesão neoplásica maligna, conforme Hanahan e Weinberg ⁽¹⁹⁾ são os seguintes: 1) capacidade da célula autodividir-se, 2) insensibilidade aos fatores de inibição de crescimento, 3) escape dos mecanismos de morte celular programada, 4) capacidade ilimitada de dividir-se, 5) capacidade de estimular angiogênese, e 6) invasão dos tecidos. A partir destas alterações, surgem as neoplasias. Assim, todo o processo de fiscalização da proliferação celular e sinalização, tanto intracelular como extracelular deve estar íntegro para que não ocorra a multiplicação de células danificadas. Dentre as proteínas que são responsáveis por regularizar estes processos, estão as HSPs ⁽¹⁴⁾.

As HSP90 são necessárias para estabilizar a estrutura de receptores, proteínas quinases e fatores de transcrição, que são importantes para o ciclo celular. Ao se ligarem às proteínas alteradas, acabam permitindo que as mesmas permaneçam estáveis e não sejam destruídas ⁽¹⁴⁾. Outra ação das HSP90 é manter a telomerase ativa, enzima responsável por estabilizar os telômeros, que são fileiras de nucleotídeos localizados no final dos cromossomos. Os telômeros não codificam proteínas, mas protegem o centro da fita de DNA, onde está a informação genética essencial à célula.

A inibição da morte celular programada é uma ação importante na carcinogênese e existem evidências que as HSP27 e HSP70 inibem a apoptose dependente de caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), que são enzimas pertencentes à família das cisteínas proteases; com capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato. Quando ativadas têm a capacidade de degradar outras proteínas,

levando à fragmentação do DNA e morte celular. A diminuição da taxa de apoptose é um achado comum no câncer de mama ^(14, 20, 21).

As HSP70 estão relacionadas à mutação do gene p53. Este gene, conhecido como supressor tumoral, é ativado quando a célula sofre algum tipo de estresse ou dano; com a ativação, é codificada uma proteína citoplasmática que recebe o nome de Tp53, que bloqueia a divisão celular para permitir o reparo da célula ou induzir a apoptose, quando este reparo não pode ser feito. A mutação neste gene está presente em mais de 50% das pacientes com tumores malignos de diversos sítios. Em pacientes portadoras desta mutação, o câncer de mama tende a evoluir com pior sobrevida global e pior sobrevida livre de doença. Sabe-se que a proteína resultante do gene p53 mutado estimula a expressão da HSP70, então, a célula além de perder a função do p53 como gene supressor tumoral, apresenta sua multiplicação estimulada pelo aumento da HSP70 ⁽²²⁻²⁴⁾.

A superexpressão da HSP70 também está relacionada à menor diferenciação celular, metástases linfonodais e menor resposta aos tratamentos quimioterápicos. Por tais razões, esta proteína pode ser um adequado alvo para drogas anticâncer ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

Chatterjee e colaboradores ⁽²⁸⁾ demonstraram o papel do fator de transcrição 1 das proteínas de choque térmico (HSF1) na carcinogênese. Quando a célula não está sob situação de estresse, o mesmo encontra-se no citoplasma ligado às proteínas de choque térmico; porém, quando a célula sofre alguma injúria externa (calor, presença de metal pesado, radicais livres de oxigênio, alguns aminoácidos e toxinas) ou interna (isquemia ou hipoxia, hipertrofia, envelhecimento celular/apoptose, inflamação, infecção viral ou bacteriana, lesão tecidual), ocorre a dissociação do HSF1 da HSP e o HSF1 livre dirige-se ao núcleo celular, estimulando a produção de mais HSPs; estas, então, dirigem-se ao citoplasma, em maior número, para proteger a célula, impedindo que esta seja levada à apoptose, conforme demonstrado na Figura 1.

Fonte: Chatterjee e colaboradores, 2017 ⁽²⁸⁾

Figura 1 - Ativação do HSF1 por injúria à célula, resultando no aumento da produção das HSPs

Portanto, as HSP27 e HSP70 atuam, bloqueando os processos que levam à apoptose celular, por inibição da via intrínseca (dependente da mitocôndria) e da via extrínseca (inibição da caspase 9 no citoplasma). A HSP70 também bloqueia os efeitos pró-senescência da proteína p53. Outro mecanismo envolvido na manutenção da divisão celular é a ligação da HSP90 com a telomerase, como descrito anteriormente, estimulando a formação de telômeros e impedindo que a célula entre em senescência. A Figura 2 ilustra o mecanismo de ação das HSPs na perpetuação de uma célula tumoral ⁽⁹⁾.

Fonte: Calderwood e colaboradores, 2006 ⁽⁹⁾

Figura 2 - Atuação das HSPs nas vias de apoptose e senescência

1.4 MENSURAÇÕES DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

A maioria das pesquisas que avaliaram a expressão das HSPs nas neoplasias malignas utilizaram como material de estudo fragmentos de tecido obtidos por biópsia ou peça cirúrgica do tecido alterado. Entretanto, em alguns tipos de câncer, como o de pâncreas, não é possível obter o tecido para análise, a menos que seja feita uma ressecção cirúrgica. Então, na busca de marcadores que auxiliassem no diagnóstico do câncer de pâncreas, foram estudados diferentes biomarcadores e, entre estes, as HSP70. A mensuração de HSP70 no soro de pacientes com câncer de pâncreas mostrou-se como um possível teste diagnóstico não invasivo e confiável para a detecção precoce dessa neoplasia ⁽²⁹⁾. De modo semelhante, Sheng e colaboradores

⁽³⁰⁾ também demonstraram a relação dos níveis teciduais de HSP 70 com os níveis séricos de tal proteína, elaborando nesse estudo um modelo de indução de hepatocarcinoma em ratos. Os níveis das HSP70 no sangue periférico e no tecido hepático foram avaliados, usando as técnicas de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e *Western blotting* e dosados após 2, 4, 8, 14, 18 e 21 semanas da indução do hepatocarcinoma; a avaliação das proteínas no tecido hepático foi feita por imunohistoquímica. Os níveis séricos de HSP70 aumentaram gradualmente com o prolongamento do tempo de indução da hepatocarcinogênese em ratos, demonstrando a correlação entre o aumento das HSPs teciduais com o aumento das HSPs séricas, assim como a participação desta HSP na carcinogênese.

Korneeva e colaboradores ⁽³¹⁾ realizaram estudo avaliando as HSPs séricas em pacientes com diferentes tipos de câncer ginecológico, comparativamente a mulheres saudáveis. A presença de anticorpos anti HSP27 foi avaliada em um total de 96 pacientes com câncer, sendo 34 de ovário, 34 de endométrio, 10 de colo do útero e útero, cinco de vulva e vagina e 13 em outros sítios (peritoneal, vagina ou colon, vulva, mama, intestino ou leiomiossarcoma e de sítio primário desconhecido), comparativamente a 29 pacientes saudáveis e 23 pacientes com tumores benignos. Anticorpos anti HSP27 foram encontrados em apenas um dos controles (1/29, 3,4%), em um dos casos de neoplasia benigna (1/23, 4,3%) e em 39 pacientes com câncer ginecológico (39/96, 40,6%); a diferença entre os três grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,0004$). Dentre as pacientes com câncer ginecológico, foram encontrados anticorpos anti HSP 27 em 17 casos de câncer de ovário (50%), 13 casos de câncer de endométrio (38,2%), três casos de câncer de colo do útero e útero (30%), três de câncer de vulva e vagina (60%) e três de outros subtipos (23,1%), mostrando, então, a relação da presença da HSP 27 (demonstrada pelo anticorpo anti HSP27) e o câncer ginecológico.

1.5 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E CÂNCER DE MAMA

Gunaldi e colaboradores ⁽³²⁾ analisaram o nível sérico das HSP70 em pacientes com câncer de mama na Turquia; o objetivo deste estudo foi determinar o nível sérico de HSP70 como teste diagnóstico e o melhor valor preditivo para câncer de mama em tais pacientes. Foram analisadas 45 pacientes com a neoplasia e 16 mulheres saudáveis, utilizando-se a técnica de ELISA para mensurar os níveis séricos de HSP70. Tais níveis foram significativamente mais elevados nas pacientes com câncer de mama do que no grupo controle ($5,98 \pm 2,05$ versus $1,49 \pm 0,47$ ng / ml, $p = 0,001$). O nível de HSP 70 $> 2,41$ ng / ml foi o melhor valor de corte para predizer câncer de mama (97,78% de sensibilidade e 93,75% de especificidade). Tais resultados sugerem que a HSP70 pode ser usada como um possível teste diagnóstico para câncer de mama. É importante lembrar que a mamografia apresenta sensibilidade entre 88% e 93,1% e especificidade entre 85% e 94,2% ⁽³³⁾.

Em estudo realizado no Irã, Homaei-Shandiz e colaboradores ⁽³⁴⁾, avaliaram a HSP27 sérica em 97 mulheres com câncer de mama, comparativamente a 65 controles e encontraram níveis elevados nas pacientes com a neoplasia ($p < 0,001$). Os autores não conseguiram relacionar o aumento dessa proteína com recidiva em 2 anos, estágio da doença (I e II em comparação com estágio III) e presença de receptor de estrogênio positivo versus negativo, demonstrando que são necessários mais estudos para avaliar a relação da HSP27 com o câncer de mama.

Takahashi e colaboradores ⁽³⁵⁾, em estudo realizado no Japão, buscaram avaliar a existência de correlação das HSP70 com os receptores de estrogênio em pacientes com câncer de mama. Foram avaliadas 124 peças cirúrgicas em relação à presença de HSP70, p53 e receptor de estrogênio (RE). A positividade para a HSP70 foi maior na presença do receptor de estrogênio, estando presente em 80% dos casos com receptor de estrogênio fortemente positivo e em 39% dos casos com receptor negativo ($p < 0,008$). Ao contrário do que ocorreu com a HSP70, o p53 foi encontrado em maior

quantidade nos casos de receptor de estrogênio negativo ou fracamente positivo, sua expressão diminuiu progressivamente com o aumento da positividade para o RE; não foi encontrado p53 nos casos de receptor de estrogênio fortemente positivo ($P < 0,003$). Tais resultados sugerem que a HSP70 pode estar relacionada a câncer de mama positivo para receptor de estrogênio.

Outro estudo realizado por Takahashi e colaboradores ⁽³⁶⁾ analisou 116 peças de câncer de mama invasivo, buscando avaliar a correlação da HSP27 com a presença de RE. Dentre os 75 casos com RE positivo, 37 (49%) apresentaram superexpressão da HSP27 e, dentre, os 41 casos RE negativos, apenas 7 (17%) apresentaram aumento da HSP27, o que levou à hipótese que o estrogênio, ao se ligar a seu receptor, estimule a produção citoplasmática da HSP27.

Segundo a OMS ⁽³⁷⁾, o câncer de mama é classificado, de acordo com as características histopatológicas em: carcinoma ductal *in situ*, invasivo tipo não especial, lobular invasivo, tubular, cribiforme, medular, mucinoso, diferenciação apócrina, diferenciação em anel de sinete, micropapilar invasivo, metaplásico e tipos raros, como carcinoma com achados neuroendócrinos, secretório, dentre outros. Pode ser também classificado, de acordo com a análise do perfil de expressão gênica, avaliado pela metodologia de microarranjos de DNA, em cinco subgrupos diferentes: luminal A, luminal B, HER 2+, tipo mama normal e basaloide. (38). Uma correta avaliação do subtipo se faz necessária para ser oferecido à paciente o tratamento mais adequado para cada caso.

Nos últimos anos, o tratamento do câncer de mama vem se tornando cada vez mais individualizado. Em 2017 a *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* publicou a oitava edição do estadiamento patológico TNM (tamanho do tumor, acometimento linfonodal e presença de metástase), incorporando ao mesmo as informações sobre grau do tumor, presença de receptor de estrogênio, receptor de progesterona, expressão do HER 2. Houve também a inclusão de testes multigênicos, que avaliam o risco de

recorrência (*oncotypeDX*[®], *Mammaprint*[®], *Endopredict*[®], *PAM50*[®], *Breast Cancer Index*[®]). Assim, tal estadiamento, mais completo, recebeu a denominação de “estadiamento prognóstico”. Esta nova classificação permite que o tratamento seja mais específico para cada paciente ⁽³⁹⁾.

Atualmente, o tratamento da neoplasia maligna de mama é composto por cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia, terapia – alvo (como terapia anti Her2) e radioterapia, sendo que a opção do tratamento a ser utilizada leva em consideração o estadiamento anatômico e, mais atualmente, o estadiamento prognóstico ^(39, 40). A cada ano, os pesquisadores buscam novas modalidades de tratamento visando maior sobrevida livre de doença, sobrevida global e sobrevida livre de progressão. São exemplos de recentes estudos o uso da carboplatina no tratamento neoadjuvante de pacientes com o subtipo triplo negativo associada ao tratamento com doxorubicina e paclitaxel, o uso de olaparibe (inibidor das PARP – enzimas responsáveis por reparar o DNA danificado) em pacientes com metástases de tumores triplo negativos e mutação no gene BRCA. Portanto, faz-se cada vez mais necessária a busca por novos tratamentos, para um melhor controle da doença e terapêutica adequada a cada paciente ⁽⁴¹⁾.

Neste cenário, as HSPs, particularmente a HSP70, tornam-se possíveis alvos terapêuticos, já que participam do processo de carcinogênese. A associação da expressão das HSPs com parâmetros clínicos e histopatológicos e com a sobrevida livre de doença vem sendo estudadas no carcinoma de mama. Foram evidenciados níveis séricos significativamente mais elevados das proteínas HSP27, HSP70 e HSP90 em pacientes com carcinomas ductais invasivos e lobulares invasivos, comparativamente aos carcinomas mucinosos. A expressão aumentada de HSP70 e HSP90 foi associada com menor sobrevida ^(42, 43).

Metanálise realizada por Dimas e colaboradores ⁽⁴²⁾, com o objetivo de determinar a relação entre as HSP70 e HSP90 com o prognóstico do câncer de mama, encontrou um total de 23 estudos elegíveis dentre 1.369 realizados, totalizando 7.288 casos de câncer de mama. Os estudos incluídos avaliaram

as HSPs teciduais. A prevalência das HSPs foi classificada em alta (10% das amostras com maior expressão) e baixa (10% das amostras com menor expressão). A alta prevalência de HSP90 foi associada com pior sobrevida global (RR = 1,48, IC 95% = 1,21-1,82) e tendência à pior sobrevida livre de doença (RR 1,46, IC 95% = 0,98 a 2,16). De modo semelhante, a alta expressão de HSP70 correlacionou-se com pior sobrevida livre de doença (RR agrupada = 1,77, IC 95% = 1,71-2,82). Não foram observadas associações entre a expressão de HSP70 e HSP90 com o grau histológico, tamanho do tumor, metástase nodal ou idade da paciente no momento do diagnóstico, indicando que são necessários mais estudos para compreender melhor a relação entre o câncer de mama e a superexpressão das HSPs.

As células tumorais tipicamente expressam níveis maiores de HSPs e parecem ser mais dependentes destas proteínas do que as células normais. O aumento das proteínas de choque térmico parece ser uma consequência das condições hostis criadas nas células tumorais pelos efeitos de desregulação dos oncogenes e dos genes supressores tumorais. Outra causa de aumento das HSPs pode ser o microambiente hostil que existe nos tumores sólidos (privação de nutrientes, hipoxia e acidose). A expressão aumentada das HSPs não apenas permite às células tolerar as mutações cumulativas e a expressão de proteínas aberrantes que, em outro caso, poderiam ser letais, mas também promove a sobrevivência celular por meio da função antiapoptótica das HSPs. Diante da hipótese de que estas proteínas exercem grande influência na progressão do câncer, sua inibição é um alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas ^(27, 38, 44-46).

Potenciais alvos terapêuticos devem atuar na indução da apoptose, inibição da sinalização para crescimento celular e angiogênese e na sensibilização das células cancerígenas aos tratamentos, resultando em lise celular facilitada quando ocorre a exposição a situações de hipoxia ou ao tratamento com quimioterápicos ^(9, 20, 47-49).

Vargas-Roig e colaboradores ⁽⁴³⁾ analisaram, em material de 20 biópsias de câncer de mama, a presença de anticorpos anti HSP70 e anti

HSP27 e sua relação com marcadores de proliferação celular (expressão de antígeno nuclear de proliferação celular). Os resultados demonstraram que cerca de 85% dos casos apresentavam aumento da expressão da HSP70, sugerindo que esta se relaciona com a proliferação das células tumorais. O estudo também analisou a HSP27 e encontrou, em 84% dos casos, uma relação inversa entre esta e os marcadores de proliferação celular, mostrando quanto maior a expressão da HSP27 menor a proliferação celular. Este estudo sugere que a HSP27 pode estar relacionada com menor proliferação e maior diferenciação celular; contrariamente, a HSP70 parece estar relacionada à maior proliferação celular, podendo, então, ser um potencial alvo para o tratamento do câncer de mama.

A HSP90, quando superexpressa, estimula o fator de transcrição HIF1 α (sensor de hipoxia tumoral), aumentando a proliferação vascular ao redor das células tumorais, facilitando, a entrada destas células na circulação sanguínea e consequente invasão de outros tecidos (metástases) ⁽⁵⁰⁾. Estudo realizado por Sun e colaboradores ⁽⁵¹⁾ avaliou os antibióticos ansamicina, incluindo geldanamicina e seu análogo alilamino-17-desmetoxigdanamicina, que se ligam ao sítio da ATP da HSP90 e interrompem sua associação com esta via de sinalização, inibindo, então, a angiogênese. A HSP90 pode ser um possível alvo para terapia antiangiogênica contra o câncer ⁽⁵¹⁾.

Um outro inibidor da HSP90, que bloqueia a ligação desta HSP com as oncoproteínas (proteínas que estão danificadas e estabilizadas pelas HSP90) ganetespib, foi utilizado para tratar 22 pacientes com câncer de mama metastático em monoterapia (estudo coorte não randomizado), e que a maioria das pacientes estava na segunda linha de tratamento. O grupo que apresentou melhor resposta ao medicamento foi o HER 2 positivo; os efeitos colaterais foram leves a moderados, incluindo diarreia, fadiga, náusea e reação de hipersensibilidade. Este estudo abre caminhos para novas opções de tratamentos para o subgrupo HER2 ⁽⁵²⁾.

Alguns estudos têm avaliado inibidores da HSP70 e sua ação anticâncer. A maioria dos mesmos é ainda experimental e os que

apresentaram melhor resposta foram os que realizaram bloqueios de múltiplas vias, como a ação anti HSP90 e anti HSP70, em tumores de pulmão subtipo não pequenas células. Apesar do número reduzido de amostras, estes estudos demonstram a diminuição da proliferação celular dos tumores com a utilização de drogas anti HSP70 ⁽⁵³⁾.

Frente ao aumento de incidência da neoplasia maligna mamária e frente à alta morbimortalidade desta doença, novos métodos de diagnóstico e novos tratamentos estão sendo estudados, com o intuito de promover melhor controle da doença. Existem evidências de que as proteínas de choque térmico estão relacionadas aos mecanismos da carcinogênese e também que apresentam valores elevados em pacientes com câncer de mama. São necessários novos estudos para aquilatar o real papel das HSPs nesta neoplasia e, de igual modo, determinar se essas proteínas poderiam ser utilizadas no diagnóstico e como alvos terapêuticos. Frente à inexistência de estudos correlacionando as HSPs com câncer de mama em mulheres brasileiras, propusemo-nos a realizar a presente pesquisa. Optamos por avaliar a HSP70 em razão da existência de maior número de estudos na literatura referente ao papel desta proteína no câncer de mama.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o nível sérico da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) em mulheres portadoras de câncer de mama, comparativamente a mulheres sem esta neoplasia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar os níveis séricos de HSP70 em mulheres portadoras de carcinoma de mama com as seguintes características tumorais:

1. Subtipo histológico;
2. Receptores hormonais e HER2 definidos pela imuno-histoquímica;
3. Grau histológico;
4. Estadiamento;
5. Grau nuclear;
6. Índice de proliferação celular (KI67);
7. Presença de invasão linfática ou de vasos.

3 Métodos

3 MÉTODOS

Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (número do projeto 1035/2016) (em anexo) e, posteriormente, encaminhado à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq), processo número 2.426.939 (anexo). Após esta aprovação, o mesmo foi introduzido na PLATAFORMA BRASIL.

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal analítico, caso controle.

3.2 SUJEITOS

As pacientes foram selecionadas nos seguintes setores:

- Setor de Mastologia da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, localizado no 5º andar do Prédio dos Ambulatórios do Hospital das Clínicas, situado à Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Cerqueira César, São Paulo, Brasil.
- Setor de Mastologia da Divisão de Clínica Ginecológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, localizado no 5º andar, na Avenida Doutor Arnaldo, 251, Cerqueira César, São Paulo, Brasil.

A seleção de pacientes para o estudo ocorreu entre setembro de 2017 e dezembro de 2018. Neste período, todas as pacientes com diagnóstico de câncer de mama que foram atendidas no Ambulatório de Primeira Consulta

do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que respeitassem os critérios de inclusão foram convidadas a participar. Tais pacientes caracterizaram o grupo estudo. Para o grupo controle, foram convidadas pacientes sem diagnóstico de câncer de mama e que respeitassem os critérios de inclusão, atendidas no mesmo período, no Ambulatório Geral Didático e na triagem do Setor de Mastologia da Divisão de Ginecologia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão dos grupos estudo e controle

Critérios de inclusão do grupo estudo

- Mulheres na faixa etária compreendida entre 25 e 75 anos de idade;
- Diagnóstico histológico de câncer de mama;
- Ausência de tratamento prévio (cirúrgico, quimioterápico, radioterápico, terapia alvo ou hormonioterapia) para câncer de mama;
- Ausência de sinais ou sintomas atuais e/ou sem história pregressa de outras neoplasias.

Critérios de inclusão do grupo controle

- Mulheres na faixa etária compreendida entre 25 e 75 anos de idade;
- Ausência de sinais ou sintomas atuais e/ou sem história pregressa de neoplasias.

Critérios de exclusão do grupo estudo

- Presença neoplasia de mama não carcinoma, como sarcoma ou tumor filóide;
- Outras comorbidades conhecidas: nefropatias, hepatopatias, cardiopatias, hematopatias, doenças imunológicas, outras neoplasias.

Critérios de exclusão do grupo controle

- Presença de quaisquer neoplasia;
- Outras comorbidades conhecidas: nefropatias, hepatopatias, cardiopatias, hematopatias, doenças imunológicas, outras neoplasias.

3.3 MÉTODO DE ESTUDO

No momento da consulta, a paciente era informada sobre o estudo. Se aceitasse participar e respeitasse os critérios de inclusão e exclusão recebia o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (anexo). Após a leitura e esclarecimento de eventuais dúvidas, o referido termo era assinado e a paciente incluída no estudo.

Ao término da consulta, eram coletados 10 ml de sangue em tubos simples. As amostras eram transportadas até o Laboratório de Ginecologia Molecular e Estrutural (LIM58) da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em até 30 minutos após a coleta para a centrifugação por 15 minutos a 1000×g em temperatura entre 2 e 8 graus *Celsius*. O sobrenadante era coletado por pipetas e estocado em alíquotas à temperatura de -80°C. O soro era testado para as concentrações de anticorpos específicos contra as proteínas de choque térmico, HSP70 por meio de testes comerciais ELISA, de acordo com as instruções do fabricante

Elabscience® (*Houston, Texas, USA*). Para a realização deste teste era utilizada uma placa de micro ELISA preparada com anticorpos específicos para HSP70 humano. As amostras dos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama) eram adicionadas aos poços adequados e aguardava-se por 90 minutos à temperatura de 37°C. Em seguida, acrescentava-se o anticorpo de detecção biotilado (anticorpo formado por proteína acoplada a biotina) específico para o HSP70 humano e a placa era incubada por 1 hora à temperatura de 37 °C. As microplacas eram lavadas, sendo acrescentado o composto *Avidin-Horseradish Peroxidase* - HRP. Avidin é uma glicoproteína que, facilmente, liga-se à biotina; peroxidase é uma enzima encontrada no raiz forte que catalisa a ligação entre a biotina e o Avidin. A seguir, aguardava-se por mais 30 minutos à temperatura de 37 °C. Após esta incubação, os componentes livres eram novamente lavados. O passo seguinte era a adição do reagente de substrato aos poços, deixando-se novamente incubados a 37 °C por 15 minutos. Após este tempo, observava-se a coloração azul nos poços que continham a combinação de HSP70 + anticorpo anti HSP70 biotilado + conjugado Avidin-HRP. A reação enzima-substrato era finalizada com a adição da *stop solution*, realizando-se a leitura da HSP70 pela densidade óptica (DO), cujo valor era proporcional à concentração da HSP70.

Os dados demográficos e clínicos das pacientes participantes do estudo foram obtidos pela pesquisadora por meio de consulta aos prontuários eletrônicos, de acordo com o padrão de atendimento dos Setores de Mastologia da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, respeitando o sigilo destas informações.

3.4 CÁLCULO AMOSTRAL

Com base na literatura avaliada, o valor médio de HSP70 em pacientes com câncer de mama foi 5,98 ng/ml (DP = 2,05) e, no grupo controle, foi de 1,49 ng/ml (DP = 1,49) ⁽³²⁾. Usando-se a variação do grupo câncer de mama, pois variou mais, e supondo-se encontrar, pelo menos, dois pontos de diferença entre mulheres com câncer de mama e controles, com 95% de confiança e 95% de poder, a amostra necessária para realização do estudo foi de 28 mulheres em cada grupo.

Em razão da disponibilidade de pacientes nos ambulatórios dos Setores de Mastologia da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo foi incluído no estudo um número maior de pacientes do que o determinado pelo cálculo amostral.

3.5 RECURSOS FINANCEIROS

Os recursos do Programa Ciências sem Fronteiras da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) foram utilizados.

4 Análise Estatística

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características quantitativas das pacientes foram descritas conforme os grupos com uso de medidas resumo (média, desvio-padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas com uso de testes t-Student ou testes Mann-Whitney ⁽⁵⁴⁾. As características qualitativas foram descritas, segundo os grupos com uso de frequências absolutas e relativas e as associações verificadas com o uso de testes Qui-quadrado ou testes exatos (teste exato de Fisher ou teste da razão de verossimilhanças) ⁽⁵⁴⁾. Para comparação da HSP70 entre os grupos, foram realizados o teste sem ajuste e o teste ajustando as características que diferiram entre os grupos com uso do modelo linear generalizado (MLG), com distribuição gama e função de ligação identidade ⁽⁵⁵⁾.

Nas pacientes com câncer de mama, os valores do marcador HSP70 foram descritos com uso de medidas resumo; os valores entre as categorias foram comparados com uso de testes Mann-Whitney, para variáveis com duas categorias, ou testes Kruskal-Wallis, para variáveis com mais de duas categorias ⁽⁵⁴⁾. As correlações de Spearman entre o marcador e as características quantitativas foram calculadas ⁽⁵⁴⁾. Para as variáveis que apresentaram níveis descritivos inferiores a 0,2 nas análises não ajustadas ($p < 0,2$) e que possuíam plausibilidade biológica para influenciar no marcador foi utilizado o modelo linear generalizado (MLG).

As análises foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 22.0 e tabuladas com uso do *software* Microsoft-Excel 2010, os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

O estudo incluiu 135 mulheres, mas 14 foram excluídas (seis do grupo controle e oito do grupo estudo) em razão da ocorrência de hemólise nas amostras a serem analisadas. Assim, foram analisadas 59 amostras do grupo controle e 62 do grupo estudo.

A Tabela 1 ilustra a distribuição dos dados sociodemográficos: idade, raça, escolaridade e estado civil, nos grupos controle e estudo.

Tabela 1 - Características sociodemográficas dos grupos controle (mulheres sem câncer de mama) e estudo (mulheres com câncer de mama)

Variável	Grupo		Total (N = 121)	p
	Controle (N = 59)	Estudo (N = 62)		
Idade (anos)				0,275**
média ± DP	52 ± 13,1	54,3 ± 9	53,2 ± 11,2	
mediana (mín.; máx.)	55 (25; 73)	52 (38; 74)	52 (25; 74)	
Raça, n (%)				<0,001#
Branca	50 (84,7)	34 (54,8)	84 (69,4)	
Negra	0 (0)	9 (14,5)	9 (7,4)	
Parda	9 (15,3)	19 (30,6)	28 (23,1)	
Escolaridade, n (%)				<0,001
Fundamental incompleto	11 (19)	32 (55,2)	43 (37,1)	
Fundamental completo	22 (37,9)	8 (13,8)	30 (25,9)	
Ensino médio completo	13 (22,4)	13 (22,4)	26 (22,4)	
Superior completo	12 (20,7)	5 (8,6)	17 (14,7)	
Estado civil, n (%)				0,759#
Casada	26 (44,1)	32 (52,5)	58 (48,3)	
Solteira	18 (30,5)	17 (27,9)	35 (29,2)	
Separada	10 (16,9)	9 (14,8)	19 (15,8)	
Viúva	5 (8,5)	3 (4,9)	8 (6,7)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; # Teste da razão de verossimilhanças

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudo e controle com relação às variáveis idade e estado civil. Entretanto, foram observadas diferenças com relação à etnia e à escolaridade, havendo maior frequência de mulheres pardas e negras no grupo estudo, comparativamente ao controle ($p < 0,001$) e menor grau de escolaridade no grupo estudo do que no controle ($p < 0,001$). Os gráficos 4 e 5 ilustram tais achados.

Gráfico 4 - Distribuição por raça entre os grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)

Gráfico 5 - Distribuição da escolaridade nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem a neoplasia)

A Tabela 2 demonstra os resultados da avaliação do índice de massa corpórea, antecedentes pessoais (comorbidades), antecedentes familiares de câncer de mama e tabagismo em ambos os grupos.

Tabela 2 - Índice de massa corpórea, antecedentes pessoais, antecedentes familiares e tabagismo nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)

Variável	Grupo		Total (N = 121)	P
	Controle (N = 59)	Estudo (N = 62)		
IMC (Kg/m²)	(N = 47)	(N = 62)	(N = 109)	0,049**
média ± DP	27,1 ± 5,6	29,4 ± 6,2	28,4 ± 6	
mediana (mín.; máx.)	25,6 (18,6; 47,4)	29 (18; 45)	27,9 (18; 47,4)	
Nuliparidade, n (%)				0,024
Não	47 (79,7)	58 (93,5)	105 (86,8)	
Sim	12 (20,3)	4 (6,5)	16 (13,2)	
Pós menopausa, n (%)				0,400
Não	25 (42,4)	31 (50)	56 (46,3)	
Sim	34 (57,6)	31 (50)	65 (53,7)	
Terapêutica Hormonal, n (%)				>0,999*
Não	54 (91,5)	57 (91,9)	111 (91,7)	
Sim	5 (8,5)	5 (8,1)	10 (8,3)	
Hipertensão arterial sistêmica, n (%)				0,017
Não	41 (74,5)	33 (53,2)	74 (63,2)	
Sim	14 (25,5)	29 (46,8)	43 (36,8)	
Diabetes mellitus, n (%)				0,827
Não	49 (89,1)	56 (90,3)	105 (89,7)	
Sim	6 (10,9)	6 (9,7)	12 (10,3)	
Doença pulmonar obstrutiva crônica, n (%)				>0,999*
Não	54 (98,2)	61 (98,4)	115 (98,3)	
Sim	1 (1,8)	1 (1,6)	2 (1,7)	
Dislipidemia, n (%)				0,367
Não	50 (90,9)	53 (85,5)	103 (88)	
Sim	5 (9,1)	9 (14,5)	14 (12)	
Outras comorbidades, n (%)				0,181
Não	45 (81,8)	56 (90,3)	101 (86,3)	
Sim	10 (18,2)	6 (9,7)	16 (13,7)	
Antecedente familiar de câncer de mama, n (%)				0,610
Não	48 (85,7)	51 (82,3)	99 (83,9)	
Sim	8 (14,3)	11 (17,7)	19 (16,1)	
Tabagismo, n (%)				0,329#
Não	30 (88,2)	48 (77,4)	78 (81,3)	
Sim	3 (8,8)	8 (12,9)	11 (11,5)	
Ex-tabagista	1 (2,9)	6 (9,7)	7 (7,3)	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; # Teste da razão de verossimilhanças;

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que as pacientes do grupo estudo apresentaram valores de massa corpórea mais elevados do que as do grupo controle, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,049$). No grupo controle, houve maior frequência de pacientes nulíparas e hipertensas comparativamente ao grupo estudo, sendo tais diferenças também estatisticamente significativas ($p=0,024$ e $p=0,017$, respectivamente). Entretanto, com relação aos itens *status* menopausal, presença de comorbidades, antecedente familiar de câncer de mama e tabagismo, não foram observadas diferenças entre os dois grupos ($p>0,5$).

A Tabela 3 demonstra a média (desvio-padrão) e a mediana (desvio-padrão) dos valores séricos da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70).

Tabela 3 - Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)

Variável	Grupo		Total (N = 121)	p
	Controle (N = 59)	Estudo (N = 62)		
HSP70				<0,001
média ± DP	419,5 ± 408	1214,3 ± 874,8	826,7 ± 792,8	
mediana (mín.; máx.)	317 (17; 2947)	943 (160; 3632)	524 (17; 3632)	

Teste Mann-Whitney

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que a média e a mediana dos valores séricos da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) foram superiores no grupo estudo em relação ao grupo controle ($p < 0,001$); tais achados estão ilustrados no Gráfico 6. Esta diferença permaneceu estatisticamente significativa mesmo após o ajuste para raça, hipertensão arterial sistêmica e índice de massa corpórea ($p < 0,001$). Para comparação da HSP70 entre os grupos, foram realizados o teste sem ajuste e o teste ajustando as características que diferiram entre os grupos com uso do modelo linear generalizado (MLG) ⁽⁵⁵⁾.

Gráfico 6 - Distribuição dos níveis séricos da HSP 70 nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama e controle (mulheres sem câncer de mama)

Os dados da Tabela 4 representam os achados mamográficos em mulheres com câncer de mama (grupo estudo) e em mulheres sem câncer de mama (grupo controle).

Tabela 4 - Achados mamográficos presentes nos grupos estudo (mulheres com câncer de mama) e controle (mulheres sem câncer de mama)

Variável	Grupo estudo		Grupo controle		p
	n	%	n	%	
Achados mamográficos					<0,001
mamografia normal	2	3,2	29	51,8	
assimetria focal	8	12,9	0	0,0	
microcalcificações suspeitas*	10	16,1	1	1,8	
distorção arquitetural	3	4,8	0	0,0	
nódulo oval e circunscrito	1	1,6	19	33,9	
nódulo irregular	28	45,2	0	0,0	
nódulo oval com margem obscurecida ou angulada	10	16,1	7	12,5	
Total	62		56		

*microcalcificações segmentares pleomórficas ou lineares ramificadas

No grupo-controle três mulheres não realizaram mamografia.

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que as mulheres do grupo estudo apresentaram maior número de lesões na mamografia ($p < 0,01$). Em ambos os grupos, o principal achado foi nódulo de mama e, em seguida, microcalcificações, mas ressalta-se que os nódulos no grupo estudo eram sobretudo irregulares, perpendiculares à pele e com sombra acústica posterior, os nódulos no grupo controle eram circunscritos, paralelos à pele e sem sombra acústica posterior. No grupo estudo, as microcalcificações eram amorfas, segmentares ou lineares e no grupo controle puntiformes ou em leite de cálcio (calcificações benignas).

A Tabela 5 demonstra os valores séricos da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) nas mulheres com câncer de mama, segundo raça, antecedentes ginecológicos e obstétricos (*status* menopausal e paridade), terapêutica hormonal, antecedentes pessoais (comorbidades), antecedentes familiares de câncer de mama e tabagismo.

Tabela 5 - Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica em mulheres com câncer de mama, segundo raça, antecedentes ginecológicos, terapêutica de reposição hormonal, antecedentes pessoais, familiares e tabagismo

Variável	HSP70		N	p
	média ± DP	mediana (mín.; máx.)		
Raça				0,093£
Branca	1009,1 ± 753,3	790 (169; 3054)	34	
Negra	1188,3 ± 950,9	768 (240; 2858)	9	
Parda	1593,8 ± 958,7	1474 (160; 3632)	19	
Nuliparidade				0,772
Não	1219 ± 891	953 (160; 3632)	58	
Sim	1145,5 ± 685	821 (768; 2172)	4	
Pós Menopausa				0,477
Não	1104,4 ± 751,9	962 (160; 2724)	31	
Sim	1324,2 ± 982,7	942 (214; 3632)	31	
Terapêutica Hormonal				0,311
Não	1234,6 ± 856,9	962 (160; 3632)	57	
Sim	983 ± 1147,8	507 (214; 3001)	5	
Hipertensão arterial sistêmica				0,199
Não	1069,9 ± 818,7	768 (160; 3632)	33	
Sim	1378,6 ± 921,1	1318 (169; 3054)	29	
Diabetes mellitus				0,297
Não	1175,4 ± 873,8	891,5 (160; 3632)	56	
Sim	1577,3 ± 872,6	1971,5 (214; 2367)	6	
Doença pulmonar obstrutiva crônica				0,484
Não	1226,2 ± 876,9	944 (160; 3632)	61	
Sim	487 ± 0	487 (487; 487)	1	
Dislipidemia				0,112
Não	1159,5 ± 884,1	801 (160; 3632)	53	
Sim	1536,9 ± 785,4	1317 (693; 3001)	9	
Outras comorbidades				0,381
Não	1252 ± 897	953 (160; 3632)	56	
Sim	862,5 ± 566,3	665 (344; 1897)	6	
Antecedente familiar de cancer de mama				0,170
Não	1276 ± 886,8	962 (160; 3632)	51	
Sim	928,2 ± 791,4	507 (169; 2724)	11	
Tabagismo				0,455£
Não	1178,8 ± 841,4	952 (160; 3054)	48	
Sim	1635,5 ± 1182,6	1209 (437; 3632)	8	
Ex-tabagista	936,5 ± 578,5	730,5 (344; 1917)	6	

Teste Mann-Whitney; £ Teste Kruskal-Wallis.

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que raça, paridade, terapêutica hormonal, antecedentes pessoais como hipertensão arterial sistêmica, *Diabetes mellitus*, doença pulmonar obstrutiva crônica, dislipidemia e outras comorbidades não influenciaram os valores séricos das HSP70 nas mulheres com câncer de mama ($p>0,05$). Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores séricos das HSP70 no que se refere aos antecedentes familiares de câncer e tabagismo ($p>0,05$).

A Tabela 6 ilustra os resultados séricos da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) nas mulheres com câncer de mama, segundo o estadiamento clínico e os achados dos exames de imagem.

Tabela 6 - Proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica em mulheres com câncer de mama, segundo estadiamento clínico e achados de exames de imagem

Variável	HSP70		N	p
	média ± DP	mediana (mín.; máx.)		
Estadiamento				0,421£
<i>In situ</i>	709,3 ± 330,5	614 (437; 1077)	3	
Câncer de mama inicial	1181,7 ± 848,5	892,5 (160; 3054)	46	
Câncer de mama localmente avançado	1446,2 ± 1022,6	1159 (344; 3632)	13	
Achados Mamográficos				0,453£
Nenhum	1241,5 ± 1315,9	1241,5 (311; 2172)	2	
Nódulo	1257 ± 947,8	942 (160; 3632)	39	
Microcalcificações	1462,8 ± 733,4	1340 (437; 2658)	10	
Assimetria	834,4 ± 715	596,5 (169; 2724)	8	
Distorção arquitetural	1106,7 ± 706,5	783 (620; 1917)	3	
Tipo de lesão				0,606£
Única	1234,8 ± 892	953 (160; 3632)	50	
Multifocal	1079,6 ± 852,5	693 (240; 2594)	11	
Multicêntrica	1669 ± 0	1669 (1669; 1669)	1	
Lesão mama contralateral				0,226
Não	1190,7 ± 861,9	942 (160; 3632)	61	
Sim	2655 ± 0	2655 (2655; 2655)	1	

Teste Mann-Whitney; £ Teste Kruskal-Wallis

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que houve aumento dos valores séricos da HSP70 com o aumento do estadiamento clínico, e que as mulheres com carcinoma ductal *in situ* apresentaram os menores valores (média 709,3 e mediana 614), e as mulheres com câncer de mama localmente avançado os maiores (média 1.446,2 e mediana 1.159); já, as mulheres com câncer de mama inicial apresentaram valores intermediários (média 1.181,7 e mediana 892,5). Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre estes grupos, o que pode ser atribuído ao tamanho restrito da amostra.

Avaliando os achados mamográficos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores da HSP70 no que se refere aos tipos de lesões encontradas nos exames de imagem e o número de focos da doença ($p>0,05$). Ao analisar presença de doença na mama contralateral, identificada em um caso, o valor sérico da HSP 70 foi superior ao das pacientes com lesão unilateral (média 2.655 x média 1.190,7).

Os valores séricos da proteína de choque térmico 70kDa (HSP 70) nas mulheres com câncer de mama, de acordo com o subtipo histológico, grau histológico e grau nuclear, presença ou não de invasão angiolinfática, expressão de receptores hormonais, superexpressão do fator de crescimento epidérmico HER2 e valores do índice de proliferação celular, o KI67 estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Proteína de choque térmico 70kDa (HSP70) sérica em mulheres com câncer de mama, segundo os achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos

Variável	HSP70		N	p
	média ± DP	mediana (mín.; máx.)		
Subtipo histológico				0,421£
carcinoma ductal <i>in situ</i>	709	614	3	
carcinoma invasivo mucinoso	833,5	833,5	2	
carcinoma ductal invasivo (tipo não especial)	1203,5	944	51	
carcinoma lobular invasivo	1685	1768	6	
Grau histológico				0,067£
1	775,9 ± 566,7	716 (169; 1825)	9	
2	1187,7 ± 892,8	801 (240; 3054)	33	
3	1587,1 ± 918,6	1545 (160; 3632)	17	
Grau nuclear				0,943
2	1223,4 ± 864,2	944 (169; 3001)	25	
3	1208,1 ± 893,6	841 (160; 3632)	37	
Invasão angiolinfática				0,884
Ausente	1233,4 ± 857,7	953 (160; 3054)	44	
Presente	1292,3 ± 1029,8	953,5 (240; 3632)	14	
Receptor de estrogênio				0,985
Negativo	1212,4 ± 805	1363 (240; 2367)	11	
Positivo	1214,7 ± 896,7	942 (160; 3632)	51	
Receptor de progesterona				0,969
Negativo	1240,4 ± 846,8	1282 (160; 2858)	18	
Positivo	1203,6 ± 895,4	891,5 (169; 3632)	44	
HER2				0,603
Negativo	1164,6 ± 824,1	942 (169; 3632)	47	
Positivo	1450,6 ± 1088,5	1363 (160; 3001)	13	
Ki-67 (%)				0,055£
< 15	627,9 ± 348,4	507 (214; 1330)	10	
15 a 30	1340,2 ± 849	1051,5 (337; 3054)	10	
> 30	1371,2 ± 939,7	1201 (160; 3632)	39	

Teste Mann-Whitney; £ Teste Kruskal-Wallis; r: Correlação de Spearman

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que os valores da HSP70 foram menores nos casos de carcinoma ductal *in situ* (média 709) e maiores nos carcinomas lobulares invasivos (média 1.685). Os carcinomas invasivos mucinosos apresentaram valores inferiores (média 833,5) em relação aos carcinomas invasivos do tipo não especial (média 1.203,5). Apesar da variação do valor sérico da HSP70, entre estes subtipos histológicos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos, provavelmente em razão do tamanho da amostra.

Houve aumento dos valores séricos das HSP70 com o aumento do grau histológico, sendo que os casos com grau histológico 1 apresentaram valores menores (média 775,9), os casos com grau histológico 2 valores intermediários (média 1187,7) e os casos com grau histológico 3 apresentaram os maiores valores séricos de HSP70 (média 1587,1), novamente, seria necessária maior amostra para melhor avaliação. Em relação ao item grau nuclear, não houve diferença nos valores da HSP70 entre o graus nuclear 2 e 3. A presença de invasão angiolinfática também não mostrou diferença nos valores das HSP70 ($p>0,05$).

Os valores das HSP70 foram semelhantes na presença ou ausência de receptores hormonais ($p>0,05$). Entretanto, a superexpressão do fator epidérmico HER 2 esteve associada a valores da HSP70 mais elevados do que os valores na ausência da expressão desse marcador, sugerindo aumento da HSP70 nos casos HER2 positivos, apesar da diferença de valores não ser estatisticamente significativa.

Em relação ao índice de proliferação celular, observou-se que quanto maior o marcador KI67 maior foi o valor sérico encontrado da HSP70 ($p=0,055$).

A Tabela 8 demonstra os valores séricos da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) nas mulheres com câncer de mama invasivo, de acordo com o tamanho da lesão no exame de imagem.

Tabela 8 - Valores da proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) sérica nas mulheres com câncer de mama invasivo, de acordo com o tamanho do tumor

Variável	HSP70		N	p
	Média ± DP	mediana (mín.; máx.)		
Tamanho da lesão na mamografia (cm)				0,841
< 2	1107,8 ± 873,2	872,5 (214; 3001)	18	
2,1 a 5	1231,3 ± 911,4	841 (160; 3632)	31	
> 5	1026,4 ± 780,9	937 (99; 2658)	7	
Total			56	

Teste Kruskal-Wallis.

Fonte: A pesquisadora

Observa-se que não houve relação do valor sérico da HSP70 com o tamanho da lesão.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou 62 participantes no grupo estudo (mulheres com câncer de mama) e 59 no grupo controle (mulheres sem esta neoplasia). As médias etárias no momento da inclusão no estudo foram 54,3 anos e 52 anos, respectivamente. Em relação ao grupo estudo a média etária encontrada foi semelhante à observada no estudo Amazona, que analisou o perfil epidemiológico de 2.296 mulheres com câncer de mama no Brasil e verificou que a média etária ao diagnóstico foi 54 anos ⁽⁵⁶⁾. Achados semelhantes foram identificados por Dos-Santos-Silva e colaboradores ⁽⁵⁷⁾, ao avaliarem o perfil epidemiológico de 247.719 mulheres brasileiras com câncer de mama, sendo a média etária ao diagnóstico 55,4 anos. Em estudo realizado nos Estados Unidos, a média etária das mulheres ao diagnóstico de neoplasia maligna de mama foi 62 anos ⁽⁵⁸⁾. Estes achados demonstram que o câncer de mama acomete pacientes alguns anos antes no Brasil do que nos Estados Unidos, o que justifica a recomendação pela Sociedade Brasileira de Mastologia de realizar rastreio por mamografia anual a partir dos 40 anos, pois o diagnóstico precoce aumenta a taxa de cura e melhora o prognóstico da paciente com câncer de mama ^(2, 6).

Em relação à raça, o grupo estudo teve maior frequência de mulheres negras e pardas (45,2%) do que o controle (15,3%) ($p < 0,001$). Este achado pode estar relacionado à desigualdade social na busca pelo atendimento no Sistema Único de Saúde (SUS), já que também no grupo estudo houve uma menor escolaridade do que no controle ($P < 0,001$). Nos Estados Unidos, ao avaliar a influência da raça na incidência e mortalidade por câncer de mama, foi observada incidência semelhante entre brancas (128,7/100.000 mulheres) e negras (125,5/100.000); entretanto a população negra teve maior taxa de mortalidade do que a branca (29,5/100.000 e 20,8/100.000, respectivamente). Os autores atribuíram a maior mortalidade nas mulheres negras ao menor acesso aos tratamentos médicos em razão da menor renda do grupo ⁽⁵⁸⁾.

Nogueira e colaboradores ⁽⁵⁹⁾ realizaram estudo de coorte que analisou 472 pacientes com câncer de mama no Brasil, sendo 371 brancas e 101 negras, e encontraram que as mulheres negras apresentavam menor renda e eram usuárias do setor público em maior proporção que as mulheres brancas; além disso, a sobrevivência específica em 10 anos foi 9,5% para as mulheres brancas e 44% às negras. Nos modelos múltiplos ajustados para idade e renda, as negras mantiveram pior prognóstico (Risco relativo = 2,09; IC95%: 1,76; 2,51). Dos-Santos-Silva e colaboradores ⁽⁵⁷⁾, ao avaliarem o perfil epidemiológico de 247.719 mulheres com câncer de mama no Brasil, verificaram que estádios mais avançados foram mais frequentes em mulheres negras e em mulheres com menor escolaridade. Estes estudos ilustram a desigualdade social no país, levando a um impacto na sobrevida das pacientes. Aquelas com maior renda conseguem acesso ao sistema de saúde de forma mais rápida, em estádios iniciais da doença, tendo a possibilidade de maior sobrevida.

Ao analisar-se as características clínicas das mulheres dos dois grupos, o índice de massa corpórea (IMC) foi maior no grupo estudo (29,4 Kg/m²) que no controle (27,1 kg/m²) (p=0,049). Sabe-se que a obesidade é um fator de risco para câncer de mama em razão da conversão da androstenediona (secretada nos ovários e na suprarrenal) em estrona, por meio da atividade da enzima aromatase, presente nos adipócitos. Além disso, pessoas com maior índice de massa corpórea apresentam maior resistência insulínica e maior produção de insulina, que age em fatores de crescimento, podendo estimular o crescimento tumoral ^(60, 61). Em relação às comorbidades, o grupo controle apresentou maior frequência de hipertensão arterial sistêmica em comparação ao estudo (p 0,017).

Os antecedentes ginecológicos foram semelhantes em ambos os grupos em relação ao *status* menopausal e uso de terapêutica hormonal, mas diferentes em relação à paridade, sendo 20,3% de nulíparas no grupo controle e 6,5% no grupo estudo (p=0,024). A nuliparidade pode ser um fator de risco para o câncer de mama, cuja incidência é inversamente proporcional ao número de gestações. Entretanto alguns estudos demonstram que gestação

em idade materna avançada pode aumentar o risco para a doença ^(60, 62). Ma e colaboradores ⁽⁶²⁾ realizaram metanálise e concluíram que o risco da mulher desenvolver câncer de mama com receptores hormonais positivos era reduzido em 11% a cada gestação completa (RR por nascimento = 0,89, IC 95% = 0,84-0,94); entretanto, quando a gestação ocorria após os 30 anos, o risco de desenvolver câncer de mama receptor hormonal positivo era 27% mais elevado do que quando a gestação acontecia em idades mais jovens (RR = 1,27, 95% IC = 1,07-1,50). A gestação é uma fase importante ao amadurecimento mamário. Neste período, as células mamárias são estimuladas pelo estrogênio a aumentarem de tamanho pela proliferação do tecido conjuntivo e do epitélio dos ductos; além disso, a progesterona estimula o desenvolvimento dos lóbulos mamários. Quando a gestação ocorre em idade materna avançada, as células mamárias podem já apresentar algumas alterações em seu material genético. Estas células, ao serem estimuladas pela elevada produção hormonal que ocorre durante o período gestacional, apresentam maior predisposição à formação da neoplasia mamária. Já gestação em pacientes mais jovens possibilita o amadurecimento mamário mais precoce, tornando a célula menos predisposta a divisões e alterações de seu material genético ao longo dos anos.

Os resultados da análise da HSP70 sérica apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e estudo, sendo as médias 419,5 pg/ml e 1214,3 pg/ml, respectivamente ($p < 0,001$). Tal achado é semelhante ao encontrado por Gunaldi e colaboradores ⁽³²⁾ que, ao analisarem o valor sérico da HSP70 em 45 mulheres com câncer de mama e 16 sem a doença, obtiveram o valor médio de 1490 pg/ml nas saudáveis e de 5.980 pg/ml nas pacientes com câncer de mama. Tais resultados demonstram que as HSP70 estão aumentadas nas mulheres com câncer de mama, sugerindo uma provável participação das mesmas no processo de carcinogênese. O aumento da expressão das HSP70 pode levar à inibição da apoptose celular e também interromper o processo de senescência, que são mecanismos importantes para impedir a divisão celular desenfreada, que pode acarretar a formação de tumores ^(9, 21, 27). Estes achados aventam a

possibilidade de utilização da HSP70, como método auxiliar no diagnóstico e eventualmente, como alvo terapêutico no tratamento da neoplasia. A maioria dos estudos para as análises desta proteína utilizou peças provenientes de biópsias ou cirurgias, poucos foram os estudos que avaliaram os valores séricos das HSP70. Dimas e colaboradores ⁽⁴²⁾ realizaram metanálise com o objetivo de avaliar a expressão das HSP70 em pacientes com câncer de mama; os estudos incluídos nessa pesquisa utilizaram material de biópsia ou peça cirúrgica para realizar a avaliação. Mas a possibilidade da dosagem sérica destas proteínas certamente facilita a análise de seu valor sem a necessidade de procedimentos invasivos como biópsia ou cirurgia, otimizando o acesso à informação sobre a HSP70.

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas dentre os valores séricos de HSP70 entre as diferentes etnias nas mulheres com câncer de mama. A paridade, *status* menopausal, terapêutica hormonal e tamanho da lesão também não apresentaram diferenças significativas nos valores séricos desta proteína. Na metanálise anteriormente mencionada realizada por Dimas e colaboradores ⁽⁴²⁾, também não foram encontradas associações entre a expressão de HSP70 com o tamanho do tumor. São necessários novos estudos para analisar a relação dos valores de HSP70 com o tamanho da lesão ou antecedentes ginecológicos, como *status* menopausal, terapêutica hormonal e paridade.

No grupo estudo, ao analisar-se as comorbidades hipertensão arterial sistêmica, *Diabetes mellitus* e dislipidemia, percebe-se uma tendência de aumento do valor médio da HSP70 sérica nas mulheres com comorbidades, comparativamente às sem comorbidades, embora não haja diferenças estatisticamente significativas. O aumento das HSP70 está relacionado a maior processo inflamatório, à relação com aterosclerose, a hipertensão e o acidente vascular cerebral ⁽⁶³⁾. Zheng e colaboradores ⁽⁶⁴⁾ encontraram correlação entre HSP70 com hipertensão arterial sistêmica em 367 trabalhadores de siderúrgica. Srivastava e colaboradores ⁽⁶⁵⁾ avaliaram 132 pacientes com hipertensão arterial sistêmica e 132 pessoas sem comorbidades e encontraram a expressão dessa proteína mais elevada no

grupo estudo do que no controle. Em relação a HSP70, e *Diabetes mellitus* Garamvölgyi e colaboradores ⁽⁶⁶⁾ analisaram o nível sérico de anticorpos anti-HSP70 em 11 gestantes com diabetes pré gestacional, 38 com diabetes gestacional e 40 gestantes saudáveis e encontraram aumento da HSP70 nas gestantes com diabetes, sendo mais elevado nas com diabetes pré-gestacional. Morteza e colaboradores ⁽⁶⁷⁾ encontraram aumento de HSP70 nos casos de *Diabetes mellitus* com albuminúria. Avaliando a relação da HSP70 com dislipidemia, Guisasola e colaboradores ⁽⁶⁸⁾ analisaram o nível sérico de HSP70 em 116 pacientes sem hipercolesterolemia e 159 com hipercolesterolemia e verificaram maiores valores no grupo com hipercolesterolemia. Estes achados demonstram que a HSP encontra-se aumentada em situações de estresse, inflamação e injúria tecidual, como o que ocorre na hipertensão arterial sistêmica, no *Diabetes mellitus* e na dislipidemia ^(14, 28).

Buscando entender melhor a atuação da HSP70 nas mulheres com câncer de mama, o presente estudo avaliou o valor desta proteína nos diferentes estadiamentos da neoplasia. Foi observada tendência de aumento do nível sérico das HSP70 do estadiamento inicial da doença para o mais avançado, sendo os menores valores no carcinoma *in situ* (média 709,3 pg/ml) e os maiores nos carcinomas invasivos localmente avançados (média 1446,2 pg/ml). Entretanto as diferenças entre tais valores não foram estatisticamente significativas, possivelmente, devido ao tamanho da amostra.

A mesma observação pode ser feita ao avaliar-se o grau histológico, onde os menores valores séricos da HSP70 estiveram associados aos tumores grau histológico 1 (tumores bem diferenciados) e os maiores nos tumores grau histológico 3 (tumores indiferenciados).

Em relação ao marcador de proliferação celular, o KI67 (presente no núcleo de células que se encontram em processo de divisão celular; quanto maior o KI67 maior a proliferação celular), também ocorreu esta mesma tendência; quanto menor o índice de proliferação celular menor o valor sérico

médio da HSP70 e quanto maior foi o índice de proliferação celular maior o valor sérico médio da mesma ($p=0,055$).

Os achados sobre a correlação da proliferação e diferenciação celular com os valores da HSP70 foram semelhantes aos encontrados por Lazaris e colaboradores ⁽²⁵⁾ que analisaram a HSP70 no citoplasma celular de amostras teciduais de câncer de mama, observando que o aumento desta proteína foi relacionado à menor diferenciação celular, ou seja, a tumores com maior grau histológico. Vargas-Roig e colaboradores ⁽⁴³⁾ avaliaram biópsias de câncer de mama e encontraram correlação entre o aumento da expressão da HSP70 tecidual com o aumento do índice mitótico. Entretanto Dimas e colaboradores ⁽⁴²⁾ ao realizarem revisão sistemática da literatura, não encontraram correlação entre o grau histológico e a expressão de HSP70. Sabe-se que os tumores de mama mais indiferenciados são mais agressivos, apresentam maior acometimento linfonodal e desenvolvimento de metástases, com maior capacidade de replicação celular (maior KI67). No presente estudo, foi encontrada uma tendência de aumento dos valores séricos da HSP70 com o aumento do grau histológico e também com o aumento do valor do KI67, apesar das diferenças dos valores não serem estatisticamente significativas. Assim, provavelmente, uma amostra com maior número de casos possibilitará esclarecer melhor a correlação dos valores da HSP70 com estas características tumorais.

A avaliação da presença de receptores hormonais e do fator de crescimento HER2 é essencial para determinar o melhor tratamento, visto que se a paciente for receptor hormonal positivo, terá como possibilidades a hormonioterapia e as pacientes com tumores HER2 superexpressos serão beneficiadas com a terapia anti-HER, como trastuzumabe e pertuzumabe. No presente estudo, não foram identificadas diferenças entre os valores séricos da HSP70 nas mulheres com câncer de mama quanto à presença de receptor de estrogênio ou progesterona no tumor, porém houve um pequeno aumento do valor da HSP70 nos tumores HER2 positivos. Se esta correlação for confirmada em futuros estudos, existe a possibilidade de associar-se um medicamento anti-HSP70 à terapia anti-HER. Na literatura, existem poucos

estudos que avaliaram a presença da HSP70 e sua correlação com receptores hormonais no câncer de mama. Takahashi e colaboradores ⁽³⁵⁾, ao avaliarem 124 peças cirúrgicas de câncer de mama, encontraram maior positividade de HSP70 nos tumores com RE positivo. A HSP70 esteve aumentada em 39% dos casos RE negativo e em 80% dos casos com RE fortemente positivo ($p < 0,008$). Em relação aos receptores de progesterona (RP), Lazaris e colaboradores ⁽²⁵⁾ encontraram correlação entre aumento de HSP70 e a presença de receptor de progesterona, achado semelhante ao verificado por Dimas e colaboradores ⁽⁴²⁾ que identificaram correlação entre o aumento da HSP70 e a presença de receptores hormonais. Os poucos estudos na literatura e as informações escassas relacionando as HSPs com os receptores hormonais e HER2 no câncer de mama apontam a necessidade de novas pesquisas, para melhor compreensão da relação entre tais fatores.

O presente estudo demonstrou que, na amostra estudada, as HSP70 séricas estavam aumentadas nas pacientes com câncer de mama. Este achado reforça o papel da HSP70 na carcinogênese e evolução do câncer de mama, devido à ação antiapoptótica desta proteína, favorecendo a divisão celular desordenada. Abre-se, assim, a possibilidade de utilizar as proteínas de choque térmico como método auxiliar para o diagnóstico desta neoplasia. A associação do nível sérico da HSP70 aos exames de imagem poderá possibilitar a tomada de decisão mais precisa sobre quais pacientes deveriam ser submetidas à biópsia ou, eventualmente, necessitariam ser acompanhadas em menores intervalos de tempo. Outra possibilidade seria o uso da HSP70 como alvo para novos medicamentos contra o câncer de mama, que, ao bloquearem a ação antiapoptótica dessa proteína, evitariam a divisão da célula de modo desordenado. Novos estudos serão necessários para consolidar estes achados e melhor compreender a relação das HSPs com a diferenciação celular e com os receptores hormonais e HER2.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Na amostra estudada houve aumento significativo dos valores séricos das HSP70 nas mulheres com câncer de mama, comparativamente, às mulheres sem essa neoplasia.

Avaliando as características tumorais não foram verificadas correlações entre os níveis séricos de HSP70 e os diferentes subtipos histológicos, presença de receptores hormonais e HER2, grau nuclear e presença de invasão angiolinfática. Foi observada tendência de elevação nos valores séricos da HSP70 com o aumento do grau histológico do tumor, estadiamento mais avançado e maior índice de proliferação celular, embora os valores encontrados para os diferentes subgrupos não mostrassem diferenças estatisticamente significativas.

8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado no Hospital das Clínicas- FMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - **Avaliação das proteínas de choque térmico e de outros marcadores séricos nos carcinomas de mama**

Pesquisador principal - Iara Moreno Linhares CRM 29034

Departamento/Instituto - Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ ICHC

Você está sendo convidada a participar, voluntariamente, de um estudo que será realizado no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP e no ambulatório da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. O estudo incluirá dois grupos de pacientes: um grupo com diagnóstico de carcinoma de mama sem tratamento anterior; e um segundo grupo com idade e escolaridade semelhantes ao grupo anterior, porém sem câncer de mama.

Esse formulário de consentimento explicará a finalidade e os detalhes deste estudo. Explicará também as suas responsabilidades e seus direitos como participante.

É importante que você leia e compreenda todos os procedimentos e certifique-se que todas as suas perguntas foram respondidas antes de assinar este documento.

As proteínas de choque térmico são produzidas pelas células quando estas enfrentam situação de estresse como aumento de temperatura, doença infecciosa ou contato com elementos químicos. Trabalhos mostraram que elas podem estar aumentadas em pacientes com câncer. O mesmo acontece com os marcadores séricos de inflamação, que aumentam em situações de estresse.

Entre as funções destas proteínas estão regulação da divisão celular, reconhecimento de divisão errada e reparo de outras proteínas. Ou seja, são importantes para que a divisão celular seja feita de forma correta.

Estas proteínas podem ser quantificadas em amostras de sangue.

Este estudo busca, então, analisar se as proteínas do choque térmico e os marcadores inflamatórios estão alterados nas pacientes com câncer de mama comparando as amostras de sangue de mulheres portadoras dos variados tipos de carcinoma de mama com mulheres sem o diagnóstico de câncer de mama, atendidas no ambulatório de Mastologia do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP) e no ambulatório do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo,

Juntamente com você, caso você aceite, participarão 76 mulheres em cada grupo, totalizando 152 pacientes.

Durante o atendimento nos ambulatórios acima citados, você deve informar ao médico sobre todas as doenças atuais e tratamentos aos quais você fora ou está sendo submetida.

Serão coletados dados clínicos e demográficos de todas as participantes, bem como todas serão submetidas a exame físico geral, informações de peso e altura e avaliação de sinais vitais e colherão 10 ml de sangue para a avaliação da presença de proteínas do choque e marcadores inflamatórios. Os dados coletados serão confidenciais e apenas utilizados para a pesquisa.

A pesquisa visa obter maior conhecimento científico sobre a presença das proteínas do choque térmico e marcadores inflamatórios no câncer de mama, com o intuito de aprimorar o tratamento de pacientes com câncer. Não haverá benefícios diretos às pacientes envolvidas.

Coleta de sangue: a coleta de sangue será realizada através de punção venosa de membro superior, para retirada de 10 ml de sangue (mais ou menos 2 colher de sopa). Este procedimento poderá causar um pouco de dor na punção e a formação de equimose ou hematoma no local, embora isto não seja frequente.

Não é esperado que sua participação neste estudo acarrete em problemas de saúde para você. Entretanto, caso algum problema médico decorra diretamente de sua participação na pesquisa, é garantido a você tratamento para todos estes problemas médicos, bem como a solicitação de indenização por eventuais danos decorrentes da participação na pesquisa.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Iara Linhares, que conta com o apoio da Dra. Gabriela Boufelli de Freitas, que podem ser encontradas à Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 Instituto Central do Hospital das Clínicas 10º andar – São Paulo, CEP:05403-000 Telefone: 55-11-2661-7621. No ICESP, o Dr José Roberto Filassi, é o responsável e poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 251, 4º andar - Telefone(s) 3893 - 2000 Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CapPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Tel: 2661-7585 ou pelo e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Não serão cobrados custos dos participantes em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas.

Sua participação no estudo é totalmente voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento. Sua decisão de não participar ou de se retirar do estudo, não prejudicará nem afetará seu atendimento médico, atual ou futuro, nesta Instituição.

Entretanto, se decidir não participar mais, você deverá notificar imediatamente o médico do grupo da Mastologia que conduz seu atendimento. Isto é para sua própria segurança.

Você deverá compreender também que sua participação poderá ser encerrada, pelo médico responsável pelo atendimento, a qualquer tempo, se ele julgar ser o melhor para você. Você também será informado de toda e qualquer novo fato que possa influenciar a sua intenção de continuar ou não a participar deste estudo.

Após ler o presente documento, declaro que fui suficientemente informado a respeito do estudo “Avaliação das proteínas de choque térmico e de outros marcadores séricos nos carcinomas de mama”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dra. Iara Linhares/ Dr. José Roberto Filassi ou com a Dra. Gabriela Boufelli de Freitas sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/representante legal

Data / /

Assinatura do responsável do estudo

Data / /

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2.RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA..... (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE ..:..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

8.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo- FMUSP

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-ICESP/FMUSP. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - **Avaliação das proteínas de choque térmico e de outros marcadores séricos nos carcinomas de mama**

Pesquisador principal - Iara Moreno Linhares CRM 29034

Departamento/Instituto - Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ ICHC

Você está sendo convidada a participar, voluntariamente, de um estudo que será realizado no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP e no ambulatório da Disciplina de Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O estudo incluirá dois grupos de pacientes: um grupo com diagnóstico de carcinoma de mama sem tratamento anterior; e um segundo grupo com idade e escolaridade semelhantes ao grupo anterior, porém sem transtornos ou doenças conhecidas.

Esse formulário de consentimento explicará a finalidade e os detalhes deste estudo. Explicará também as suas responsabilidades e seus direitos como participante.

É importante que você leia e compreenda todos os procedimentos e certifique-se que todas as suas perguntas foram respondidas antes de assinar este documento.

As proteínas de choque térmico são proteínas especiais produzidas pelo organismo em diferentes situações, como por exemplo infecções, exposição a substâncias tóxicas e diversas doenças. Algumas pesquisas tem mostrado que essas proteínas atuam na evolução de alguns tipos de câncer.

O objetivo deste estudo é analisar o papel das proteínas de choque em mulheres portadoras de câncer de mama acompanhadas nos ambulatórios de Mastologia do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP), e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, comparativamente às mulheres saudáveis.

Para isso, serão estudadas 76 mulheres portadoras de câncer de mama e 76 mulheres sem a doença. Caso você aceite participar, deverá informar ao seu médico sobre todas as doenças e tratamentos atuais, assim como doenças e tratamentos que teve no passado.

Todas as participantes responderão a algumas perguntas feitas pelo médico e a seguir serão submetidas ao exame físico. A seguir, serão colhidos 10 ml (

aproximadamente duas colheres de sopa) para exames de laboratório. A coleta de sangue será realizada através de punção venosa de membro superior. Esse procedimento poderá causar um pouco de dor na punção e formação de equimose ou hematoma no local, embora isso ocorra com pouca frequência.

O sangue será armazenado de acordo com a resolução 441/2011.

Não haverá benefícios diretos às pacientes que participarem do estudo, mas apenas para o conjunto da coletividade, ao se obter maior conhecimento científico sobre o tema.

Não esperamos que você possa ter problemas de saúde devido sua participação nesse estudo. Entretanto, essa pesquisa garante tratamento para todos os problemas médicos que possam surgir, bem como a solicitação de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra. Iara Moreno Linhares e a Dra. Gabriela Boufelli de Freitas que podem ser encontradas à Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 Instituto Central do Hospital das Clínicas 10º andar – São Paulo, CEP:05403-000 Telefone: 55-11-2661-7621.

No ICESP, o Dr José Roberto Filassi , é o responsável e poderá ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 251, 4º andar - Telefone(s) 3893 - 2000.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CapPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Tel: 2661-7585 ou pelo e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas.

Sua participação no estudo é totalmente voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento. Sua decisão de não participar ou de se retirar do estudo, não prejudicará nem afetará seu atendimento médico atual ou futuro, nesta Instituição.

Entretanto, se decidir não participar mais, você deverá notificar imediatamente o seu médico. Isto é para sua própria segurança.

Você deverá compreender também que sua participação poderá ser encerrada, por seu médico, a qualquer tempo, se ele julgar ser o melhor para você. Você também será informado de toda e qualquer nova informação que possa influenciar a sua intenção de continuar ou não a participar deste estudo.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Avaliação das proteínas de choque térmico e de outros marcadores séricos nos carcinomas de mama ”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável ou a pessoa por ela delegada Dra. Gabriela Bufelli de Freitas sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante/representante legal

Data / /

Assinatura do responsável do estudo

Data / /

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**1.NOME:**.....DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO: BAIRRO:

CIDADECEP:.....

TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA..... (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

8.3 Aprovação no Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 237ª reunião no dia 14 de Fevereiro de 2017, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de pesquisa **"O "AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E DE OUTROS MARCADORES SÉRICOS NOS CARCINOMAS DE MAMA"** dos seguintes pesquisadores: Iara Moreno Linhares, José Roberto Filassi, Henrique Diório de Souza, Eiko Ines Fukazawa, Gabriela Boufelli de Freitas, Edmund Chada Baracat

São Paulo, 14 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. SEIZO MIYADAHIRA
Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

Prof. Dr. JOSÉ MARIA SOARES JÚNIOR
Vice-Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

**APROVADO PELO CONSELHO
DO DOG EM 15/02/2017**

Profa. Dra. ROSSANA P.V. FRANCISCO
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo, 25 de Novembro de 2016

Registro: NP 1035/2016

Ref. Solicitação de execução de estudo: "Avaliação das proteínas de choque térmico e de outros marcadores séricos nos carcinomas de mama".

Pesquisador Responsável: Dra. Iara Moreno Linhares
Pesquisador Executor: Dra. Gabriela Boufê de Freitas

CONSIDERAÇÕES

Estudo Observacional, para fins de Pesquisa Regular, que pretende avaliar os níveis séricos de HSPs 27 kDa (Hsp27), 60 kDa (Hsp60) e 70 kDa (Hsp70), assim como o Inibidor do checkpoint de bioquímica imunológica, a proteína sérica associada ao linfócito citotóxico (CTLA-4) em mulheres com carcinoma de mama, comparativamente a mulheres com as mesmas características socioepidemiológicas sem comorbidades.

Serão avaliadas 76 mulheres atendidas no Setor de Mastologia da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da USP-SP, as quais irão compor o grupo estudo. Serão avaliadas também 76 mulheres com idade e escolaridade pareadas com o grupo experimental, porém sem comorbidades conhecidas.

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Antes do início das atividades relacionadas ao estudo:

- Apresentar a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP para execução no ICESP conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde;
- Enviar semestralmente o status ou relatório do estudo. Projetos sem informações por mais de 1 ano serão cancelados automaticamente e impedirá a submissão de novos projetos pelos investigadores;
- Iniciar as atividades após o fornecimento de carta de aprovação da Agência de fomento;
- Enviar resultados do projeto (publicações, defesa de tese, apresentação em congressos e outros).

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral
Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral
ICESP

Versão 1.2 11 de julho de 2016

Av. Dr. Arnaldo, 251, Cerqueira César, São Paulo-SP 01224-000 - Tel.: 11 3083 2000 - www.icesp.org.br

9 Referências

9 REFERÊNCIAS

1. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global cancer in women: burden and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(4):444-57.
2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Global cancer observatory [cited 22.05.2019] Available from: <http://gco.iarc.fr/>
3. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):52-62.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Conceito e Magnitude do Câncer de Mama 2020 [Citado em: 27.07.2020] Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>.
5. World Health Organization. Estimate age-standardized incidence rates in 2018, worldwide, females, all ages [cited 22.05.2019]. Available from: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>
6. Smart CR, Hendrick RE, Rutledge JH, Smith RA. Benefit of mammography screening in women ages 40 to 49 years. Current evidence from randomized controlled trials. *Cancer.* 1995;75(7):1619-26.
7. Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L; U. S. Preventive Services Task Force. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009;151(10):727-37, W237-42.

8. Delle Urban LAB, Chala LF, Bauab SD, Schaefer MB, dos Santos RP, Maranhao NMD, Kefalas AL, Kalaf JM, Ferreira CAP, Canella EO, Peixoto JA, Amorim HLE, Camargo Jr HSA. Breast cancer screening: updated recommendations of the Brazilian College of Radiology and Diagnostic Imaging, Brazilian Breast Disease Society, and Brazilian Federation of Gynecological and Obstetrical Associations. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2017;39(10):569-75.
9. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(3):164-72.
10. Ritossa F. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia.* 1962;18(12):571-3.
11. Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein-synthesis in salivary-glands of drosophila-melanogaster - relation to chromosome puffs. *J Mol Biol.* 1974;84(3):389-98.
12. Ashburner M, Bonner JJ. The induction of gene activity in Drosophila by heat shock. *Cell.* 1979;17(2):241-54.
13. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
14. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg.* 1999;29(4):748-51.
15. Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet.* 1993;27:437-96.

16. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, Cheetham ME, Chen B, Hightower LE. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):105-11.
17. Benjamin IJ, McMillan DR. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 1998;83(2):117-32.
18. Roma P, Catapano AL. Stress proteins and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1996;127(2):147-54.
19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
20. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103.
21. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(8):299-306.
22. Tsutsumi-Ishii Y, Tadokoro K, Hanaoka F, Tsuchida N. Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell Growth Differ*. 1995;6(1):1-8.
23. Madden SL, Galella EA, Zhu J, Bertelsen AH, Beaudry GA. SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation. *Oncogene*. 1997;15(9):1079-85.
24. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, Pawitan Y, Hall P, Klaar S, Liu ET, Bergh J. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(38):13550-5.

-
25. Lazaris ACh, Chatzigianni EB, Panoussopoulos D, Tzimas GN, Davaris PS, Golematis BCh. Proliferating cell nuclear antigen and heat shock protein 70 immunolocalization in invasive ductal breast cancer not otherwise specified. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;43(1):43-51.
 26. Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jäättelä M. Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev.* 2005;19(5):570-82.
 27. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol.* 2013;87(1):19-48.
 28. Chatterjee S, Burns TF. Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9):1978.
 29. Dutta SK, Girotra M, Singla M, Dutta A, Otis Stephen F, Nair PP, Merchant NB. Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer. *Pancreas.* 2012;41(4):530-4.
 30. Sheng X, Huang T, Qin J, Yang L, Sa ZQ, Li Q. Identification of the differential expression profiles of serum and tissue proteins during rat hepatocarcinogenesis. *Technol Cancer Res Treat.* 2018;17:1-13.
 31. Korneeva I, Bongiovanni AM, Girotra M, Caputo TA, Witkin SS. Serum antibodies to the 27-kd heat shock protein in women with gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):18-21.
 32. Gunaldi M, Afsar CU, Okuturlar Y, Gedikbasi A, Kocoglu H, Kural A, Akarsu C, Gunduz U, Tiken EE. Elevated serum levels of heat shock protein 70 are associated with breast cancer. *Tohoku J Exp Med.* 2015;236(2):97-102.

-
33. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Mamografia: da prática ao controle. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//mamografia-pratica-controle-2007.pdf>.
34. Homaei-Shandiz F, Mehrad-Majd H, Tasbandi M, Aledavood A, Tavakol Afshari J, Ghavami V, Ghayour-Mobarhan M. Anti-Heat Shock Protein-27 antibody levels in women with breast cancer: association with disease complications and two-year disease-free survival. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(10):4655-9.
35. Takahashi S, Mikami T, Watanabe Y, Okazaki M, Okazaki Y, Okazaki A, Sato T, Asaishi K, Hirata K, Narimatsu E, Mori M, Sato N, Kikuchi K. Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer. *Am J Clin Pathol*. 1994;101(4):519-25.
36. Takahashi S, Narimatsu E, Asanuma H, Okazaki M, Okazaki A, Hirata K, Mori M, Chiba T, Sato N, Kikuchi K. Immunohistochemical detection of estrogen receptor in invasive human breast cancer: correlation with heat shock proteins, pS2 and oncogene products. *Oncology*. 1995;52(5):371-5.
37. International Agency for Research on Cancer IARC, Lakhani SR, Ellis I, Schnitt S, Tan P, Vijver MVd. WHO Classification of Tumours of the Breast. Fourth Edition. 4th ed. Geneva: World Health Organization; 2012.
38. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale A-L, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.

-
39. Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. New and important changes in the TNM Staging System for breast cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2018;38:457-67.
40. National Comprehensive Cancer Network - NCCN. Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Version 6.2020 Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site
41. Bartsch R, Bergen E. ASCO 2017: highlights in breast cancer. *Memo*. 2017;10(4):228-32.
42. Dimas DT, Perlepe CD, Sergentanis TN, Misitzis I, Kontzoglou K, Patsouris E, Kouraklis G, Psaltopoulou T, Nonni A. The prognostic significance of Hsp70/Hsp90 expression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res*. 2018;38(3):1551-62.
43. Vargas-Roig LM, Fanelli MA, López LA, Gago FE, Tello O, Aznar JC, Ciocca DR. Heat shock proteins and cell proliferation in human breast cancer biopsy samples. *Cancer Detect Prev*. 1997;21(5):441-51.
44. Davidson B, Valborg Reinertsen K, Trinh D, Reed W, Böhler PJ. BAG-1/SODD, HSP70, and HSP90 are potential prognostic markers of poor survival in node-negative breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2016;54:64-73.
45. Whitesell L, Santagata S, Mendillo ML, Lin NU, Proia DA, Lindquist S. HSP90 empowers evolution of resistance to hormonal therapy in human breast cancer models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(51):18297-302.
46. Calderwood SK, Gong J. Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy. *J Cell Biochem*. 2012;113(4):1096-103.
47. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(6):670-84.

-
48. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(10):761-72.
 49. Pacey S, Banerji U, Judson I, Workman P. Hsp90 inhibitors in the clinic. *Handb Exp Pharmacol*. 2006(172):331-58.
 50. Pfosser A, Thalgott M, Büttner K, Brouet A, Feron O, Boekstegers P, Kupatt C. Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia. *Cardiovasc Res*. 2005;65(3):728-36.
 51. Sun J, Liao JK. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(12):2238-44.
 52. Jhaveri K, Chandarlapaty S, Lake D, Gilewski T, Robson M, Goldfarb S, Drullinsky P, Sugarman S, Wasserheit-Leiblich C, Fasano J, Moynahan ME, D'Andre G, Lim K, Reddington L, Haque S, Patil S, Bauman L, Vukovic V, El-Hariry I, Hudis C, Modi S. A phase II open-label study of ganetespib, a novel heat shock protein 90 inhibitor for patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2014;14(3):154-60.
 53. Shevtsov M, Multhoff G, Mikhaylova E, Shibata A, Guzhova I, Margulis B. Combination of anti-cancer drugs with molecular chaperone inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).
 54. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2a ed. Massachusetts: Blackwell Science Ltd; 2003.
 55. McCullagh P, Nelder JA. *Generalized linear models*. 2a ed. New York: Chapman and Hall; 1989.
 56. Simon SD, Bines J, Werutsky G, Nunes JS, Pacheco FC, Segalla JG, Gomes AJS, Van Eyll BMHRA, Gimenes DL, Crocamo S, Freitas-Junior R, Dal

Lago L, Queiroz GS, Azevedo SJ, Rosa DD, Delgado G, Borges GS, Nascimento YV, Zaffaroni F, Martínez-Mesa J, Barrios CHE. Characteristics and prognosis of stage I-III breast cancer subtypes in Brazil: The AMAZONA retrospective cohort study. *Breast*. 2019;44:113-9.

57. Dos-Santos-Silva I, De Stavola BL, Renna NL, Nogueira MC, Aquino EML, Bustamante-Teixeira MT, Azevedo e Silva G. Ethnoracial and social trends in breast cancer staging at diagnosis in Brazil, 2001-14: a case only analysis. *Lancet Glob Health*. 2019;7(6):e784-e97.

58. DeSantis CE, Ma J, Goding Sauer A, Newman LA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):439-48.

59. Nogueira MC, Guerra MR, Cintra JRD, Corrêa CSL, Fayer VA, Bustamante-Teixeira MT. Racial disparity in 10-year breast cancer survival: a mediation analysis using potential responses approach. *Cad Saúde Pública*. 2018;34(9):e00211717.

60. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2019;11:151-64.

61. Engin A. Obesity-associated breast cancer: analysis of risk factors. *Adv Exp Med Biol*. 2017;960:571-606.

62. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R43.

63. Deniset JF, Pierce GN. Heat shock proteins: mediators of atherosclerotic development. *Curr Drug Targets*. 2015;16(8):816-26.

64. Zheng JP, Lyu Y, Li RF, Tian FJ, Mu JB. Interaction of heat shock protein 70 (HSP70) polymorphisms and occupational hazards increases the risk of hypertension in coke oven workers. *Occup Environ Med.* 2018;75(11):807-13.
65. Srivastava K, Narang R, Bhatia J, Saluja D. Expression of Heat Shock Protein 70 gene and its correlation with inflammatory markers in essential hypertension. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151060.
66. Garamvölgyi Z, Prohászka Z, Rigó J, Kecskeméti A, Molvarec A. Increased circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) levels in gestational diabetes mellitus: a pilot study. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(4):575-81.
67. Morteza A, Nakhjavani M, Larry M, Nargesi AA, Esteghamati A. Heat shock protein 70 and albuminuria in patients with type 2 diabetes: a matched case control study. *Cell Stress Chaperones.* 2013;18(6):815-9.
68. Guisasola MC, Dulín E, Almendral J, García-Barreno P. Reduction of heat shock protein antibody levels by statin therapy. *Lipids.* 2009;44(4):317-24.