UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROGRAMA INTERUNIDADES FCF/FEA/FSP

Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana Aplicada

Associação dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 com parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama: Impacto do estadiamento clínico

Bruno Aparecido Dantas de Araújo

Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo

2019

Associação dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 com parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama: Impacto do estadiamento clínico

Bruno Aparecido Dantas de Araújo

Versão Corrigida

Conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação apresentada ao Programa Interunidades em Nutrição Humana Aplicada (PRONUT/USP) como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Nutrição

Orientadora: Profa. Assoc. Dra. Nágila Raquel Teixeira Damasceno

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de
Biblioteca e Documentação do
Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de
catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira -
CRB - 8/5562

Araújo, Bruno Aparecido Dantas de
A663a Associação dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 com parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama: Impacto do estadiamento clínico. / Bruno Aparecido Dantas de Araújo. -- São Paulo, 2019.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da USP. Faculdade de Saúde Pública da USP. Curso Interunidades em Nutrição Humana Aplicada.
Orientador: Damasceno, Nágila Raquel Teixeira

1. Nutrição : Ciência dos alimentos. 2. Mama : Câncer. 3. Inflamação. 4. Estresse oxidativo I. T. II. Damasceno, Nágila Raquel Teixeira, orientador.

641.1 CDD

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que me possibilitou estudar e correr atrás dos meus sonhos, além de me dá força e apoio sempre que eu precisava, em especial minha irmã Priscilla que sempre me ajudou e apoiou em todos os momentos.

Agradeço a minha orientadora que sempre se mostrou presente e solicita para me ajudar e me acalmar. Sua companhia se fez presente desde a época da graduação, assim como na época de aprimoramento profissional no Hospital universitário da USP.

A Camila Pruper e Flavia de Conti sem as quais as análises estatísticas e meus conhecimentos seriam quase inexistentes. Obrigado por todo o ensinamento e conhecimento que foram fundamentais para a minha formação.

Também agradeço a Profa. Sara Lima por toda ajuda e pela receptividade calorosa e animada em Fortaleza.

Gostaria de agradecer ao grupo de pesquisa da Profa. Nágila que sempre contribui com ótimas sugestões, com amizades, conselhos e um convívio animador. Não há trabalho feito somente por uma pessoa, tudo é fruto de trabalho conjunto, de doações e entregas.

Por fim gostaria de agradecer a CAPES por todo o financiamento que recebi desde a Graduação até o Mestrado, assim como seu investimento no meu intercâmbio no Ciências sem Fronteiras por 14 meses na Alemanha. Período que foi crucial, tanto no meu crescimento profissional quanto pessoal. Lá tive meu primeiro contato com o manejo nutricional em pacientes com câncer.

“Não há saber mais ou saber menos. Há saberes diferentes”

Paulo Freire

RESUMO

ARAUJO, BAD. Associação dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 com parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama: impacto do estadiamento clínico. 2019. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas- PRONUT/USP, São Paulo; 2019.

Introdução: O câncer de mama (CM) correspondeu a 29,5% das neoplasias femininas em 2018, sendo que fatores relacionados ao estilo de vida, tais como alimentação podem explicar até 35% dessa neoplasia. Embora multicausal, é provável que desequilíbrio entre a ingestão de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 promova aumento na inflamação e estresse oxidativo nas diferentes etapas do processo de carcinogênese. **Objetivo**: Avaliar o impacto do estadiamento tumoral clínico na associação dos ácidos graxos ômega 3 biodisponíveis no plasma e nas membranas eritrocitárias com o estresse oxidativo e a inflamação em mulheres com câncer de mama. **Material e métodos**: Estudo caso-controle, observacional e analítico, com 87 mulheres com CM e 100 mulheres controles selecionadas do Hospital Geral de Fortaleza (HGF) no período de 2011/12. As pacientes Caso foram distribuídas, segundo estadiamento clínico (0-IIIc): <EC = estadiamento 0-II e >EC = estadiamento IIa-IIIc. De ambos os grupos, foram obtidos dados demográficos e clínicos, avaliação antropométrica e composição corporal. Os marcadores de inflamação foram compostos pelas citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e MCP-1. Ao nível plasmático avaliou-se adipocinas (leptina e adiponectina), marcadores de estresse oxidativo (TBARS, LDL (-) e 8-OHdG), assim como o conteúdo de ácidos graxos no plasma e nas membranas dos eritrócitos por cromatografia a gás. Realizou-se teste de qui-quadrado, t-student, correlação de Pearson, Mann-Whitney e regressão linear e logística e adotou-se $p<0,05$ para todos os testes. **Resultados**: Não houve diferença entre a idade nos grupos Caso e Controle, nem nos parâmetros antropométricos, com exceção da circunferência da cintura que foi maior no grupo Caso (96,2 cm versus 91,2 cm). O tempo de tabagismo nos Casos foi maior que nos Controles (20,4 anos versus 13,5 anos). Nas mulheres com CM houve predominância do subtipo tumoral ductal (79,3%) e não houve diferenças entre receptores de estrógeno, progesterona, marcador HER2 e de proliferação celular Ki67, segundo estadiamento clínico. Os Casos apresentaram maiores valores de TBARS (6,0 versus 4,7 µmol) e anticorpos anti-LDL (-) (4,6 versus 2,5 U/L) e de citocinas inflamatórias MCP-1 (357,8 versus 295,8 ng/mL) e IL-1β (2,8 versus 1,3 ng/mL). Os controles apresentaram maior concentração de IL-6 (0,9 versus 1,6 ng/mL) e IL-10 (2,8 versus 5,5 ng/mL), porém as razões entre citocinas (MCP-1, IL-1β, TNF-α, IL-6 com a IL10) dos Casos apresentaram valores maiores que os Controles. Não houve diferença entre concentrações de citocinas nos grupos segundo estadiamento. O Grupo >EC apresentou maior razão n-6/n-3 e menor concentração de DHA e maior razão linoleico/DHA incorporado nas membranas eritrocitárias. O anticorpo anti-LDL (-) se associou negativamente com tamanho tumoral, enquanto a IL-10 positivamente. Elevado conteúdo de DHA ($\geq$ 4,3%) se associou com altas concentrações de IL-10, enquanto que o EPA, DHA e a soma desses se associaram com baixa concentração de citocinas inflamatórias. Os ácidos linoleico e araquidônico apresentaram associação com altas concentrações de marcadores inflamatórios plasmáticos. **Conclusão**: Mulheres com diagnóstico de CM apresentaram concentrações superiores de biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo quando comparadas às mulheres saudáveis. Pacientes com maior estadiamento clínico apresentaram menores concentrações de ômega-3 e maiores de ômega-6. De modo contrário, esses ácidos graxos poli-insaturados modularam parâmetros inflamatórios e oxidativos.

Palavra-chave: neoplasias da mama, inflamação, estresse oxidativo, ácidos graxos ômega-3.

ABSTRACT

ARAUJO, BAD. Association of omega-3 polyunsaturated fatty acids with inflammatory parameters and oxidative stress in women with breast cancer: impact of tumor staging. (Master´s Dissertation) - Faculty of Pharmaceutical Sciences- PRONUT/USP, São Paulo; 2019.

Introduction: Breast cancer (BC) accounted for 29.5% of female neoplasms in 2018, and lifestyle factors such as diet may explain up to 35% of this cancer. Although multicausal, imbalance between omega-3 and omega-6 fatty acid intake is likely to promote increased inflammation and oxidative stress at different stages of the carcinogenesis process. **Objective**: To evaluate the impact of clinical tumor staging on the association of bioavailable omega 3 fatty acids in plasma and erythrocyte membranes with oxidative stress and inflammation in women with breast cancer. Material and methods: Case-control, observational and analytical study, with 87 women with BC and 100 control women selected from the General Hospital of Fortaleza (HGF) in 2011/12. Case patients were distributed according to clinical staging (0-IIIc): <EC = staging 0-II and> EC = staging IIa-IIIc. From both groups, demographic and clinical data, anthropometric assessment and body composition were obtained. The inflammation markers were composed of cytokines IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α and MCP-1. At the plasma level, adipokines (leptin and adiponectin), oxidative stress markers (TBARS, LDL (-) and 8-OHdG), as well as fatty acid content in plasma and erythrocyte membranes were evaluated by gas chromatography. Chi-square, t-student, Pearson correlation, Mann-Whitney and linear regression and logistic tests were performed and $p < 0.05$ was adopted for all tests. **Results**: There was no difference between age in the Case and Control groups, nor in the anthropometric parameters, except for waist circumference which was higher in the Case group (96.2 cm versus 91.2 cm). Smoking time in Cases was longer than in Controls (20.4 years versus 13.5 years). In women with BC there was a predominance of ductal tumor subtype (79.3%) and no differences between estrogen receptors, progesterone, HER2 marker and Ki67 cell proliferation, according to clinical staging. Cases had higher values of TBARS (6.0 versus 4.7 µmol) and anti-LDL (-) antibodies (4.6 versus 2.5 U / L) and inflammatory cytokines MCP-1 (357.8 versus 295 ng / mL) and IL-1β (2.8 versus 1.3 ng / mL). Controls had a higher concentration of IL-6 (0.9 versus 1.6 ng / mL) and IL-10 (2.8 versus 5.5 ng / mL), but ratios between cytokines (MCP-1, IL-1β, TNF-α, IL-6 with IL10) shows higher values than Controls. There was no difference between cytokine concentrations in the groups according to staging. Group >EC presented higher n-6 / n-3 ratio and lower DHA concentration and higher linoleic / DHA ratio incorporated in erythrocyte membranes. Anti-LDL antibody (-) was negatively associated with tumor size, while IL-10 was positively associated. High DHA content (≥ 4.3%) was associated with high IL-10 concentrations, while EPA, DHA and their sum were associated with low concentration of inflammatory cytokines. Linoleic and arachidonic acids were associated with high concentrations of plasma inflammatory markers. **Conclusion**: Women diagnosed with BC had higher concentrations of inflammatory biomarkers and oxidative stress when compared to healthy women. Patients with higher clinical staging had lower omega-3 and higher omega-6 concentrations. Conversely, these polyunsaturated fatty acids modulated inflammatory and oxidative parameters.

Keywords: breast neoplasms, inflammation, oxidative stress, omega 3 fatty acids.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....14

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA E FATORES DE RISCO 14

1.2 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA 15

1.3 EIXO INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER DE MAMA....19

1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS.....24

2. OBJETIVO 29

3. METODOLOGIA.....29

3.1 PROJETO CANCER DE MAMA 29

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO 29

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....30

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 30

3.5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO.....30

3.6 RISCOS E BENEFÍCIOS.....31

3.7 CÁLCULO AMOSTRAL.....31

3.8 GRUPOS DE ESTADIAMENTO 32

3.9 PERFIL SOCIOECONÔMICO E CLÍNICO 32

3.10 AVALIAÇAO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL.....32

3.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA 33

3.11.1 Coleta de sangue.....33

3.11.2 Biomarcadores de inflamação 33

3.11.3 Adipocinas.....34

2.11.4 Vitaminas Antioxidantes (retinol, α-tocoferol, β-caroteno).....34

3.11.4 Marcadores de estresse oxidativo.....35

3.11.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico 35

3.11.4.2 Detecção de LDL (-) no Plasma 36

3.11.4.4 Dano oxidativo ao DNA.....37

3.11.4.5 Análise do perfil de ácidos graxos no plasma e nas membranas eritrocitárias 37

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

4. ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS 40

5. RESULTADOS 40

6. DISCUSSÃO.....64

7. CONCLUSÃO.....72

8. REFERÊNCIAS 73

ANEXOS.....81

ABREVIAÇÕES

%MG- percentual de massa gorda
%MM- percentual de massa magra
8-OHdG- 8-hidroxi-2'deoxiguanosina
AJCC- *American Joint Committee on Cancer* ALA- ácido graxo alfa-linolênico (18:3, n-3) ARA- ácido graxo araquidônico (20:4, n-6)

BIA- bioimpedância elétrica
BRCA- *breast cancer gene*
CM- câncer de mama
COX- ciclooxigenase
DCNT- doença crônica não transmissível
DHA- ácido docosahexaenoico (C22:6, n-3) DNA- ácido desoxirribonucleico
DPA- ácido docosapentaenoico (C22:5, n-3) EC- estadiamento clínico
ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática EPA- ácido eicosapentaenoico (20:5, n-3)
HER2- receptor do tipo 2 de fator de crescimento epidérmico humano IFN- γ - interferon gama
IGF-1- fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL- interleucina

IMC- índice de
massa corporal
JNK- c-Jun N-
terminal quinase
LDL – lipoproteína de baixa densidade
LDL (-) – lipoproteína de baixa densidade
eletronegativa LN- ácido linoleico (C18:2, n-
6)
LOX- lipooxigenase
MCP-1 – proteína quimioatrativa de
monócito 1

n-3 - ácidos graxos poli-insaturados da
série ômega 3
n-6 – ácidos graxos poli-insaturados da
série ômega 6 NF- kB- fator nuclear kappa
B
OMS- Organização Mundial da Saúde
ONU- Organização das Nações Unidas
OPAS- Organização Pan-
Americana de Saúde PCR- proteína
C-reativa
PGE2- prostaglandina E2
Pi3K-
fosfoinositídeo 3-
quinase RP- receptor
de progesterona
RE- receptor de estrógeno
STAT3- sinalizador de transdução e ativador de
transcrição 3 TBARS- substâncias reativas ao
ácido tiobarbitúrico
TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia e compartimentos mamários.

Figura 2. Relação entre estadiamento anatomopatológico (TNM) e estadiamento clínico (0-IV).

Figura 3. Mecanismos *in situ* e sistêmica da interação entre peso e inflamação.

Figura 4. Metabolismo dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 e seus principais produtos.

Figura 5. Participação dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 na incorporação das membranas celulares e sua participação na inflamação

Figura 6. Fluxograma de determinação de ácidos graxos na membrana dos eritrócitos

Figura 7. Fluxograma de captação de pacientes

Figura 8. Concentração plasmática de citocinas

Figura 9. Concentração plasmática de marcadores de estresse oxidativo

Figura 10. Razão entre concentração plasmática de citocinas pró e anti-inflamatórias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização demográfica e antropométrica

Tabela 2. Caracterização clínica

Tabela 3. Caracterização tumoral e Índice de Karnofsky

Tabela 4. Caracterização dos parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo e citocinas

Tabela 5. Perfil dos ácidos graxos plasmáticos

Tabela 6. Perfil dos ácidos graxos incorporados à membrana eritrocitária

Tabela 7. Modelos de regressão logística múltipla segundo tamanho tumoral

Tabela 8. Modelos de regressão logística múltipla segundo citocinas

Tabela 9. Modelos de regressão logística múltipla segundo marcadores de estresse oxidativo

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA E FATORES DE RISCO

O câncer é um conjunto heterogêneo de doenças que tem como caraterística comum o crescimento rápido e desordenado de células. Durante o seu desenvolvimento as células neoplásicas podem invadir tecidos adjacentes ou outros órgãos (metástase), aumentando a agressividade da doença e diminuindo a expectativa de vida (INCA, 2019).

Segunda a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, vinculada a Organização Mundial da Saúde, foram estimados para 2018 mais de 18 milhões de novos casos de câncer no mundo, sendo que mais de 2 milhões de casos seriam somente devido ao câncer de mama, correspondendo ao segundo tipo de câncer mais frequente no mundo (OMS, 2018).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (BRASIL, 2017), foram previstos para os anos de 2018/19 mais de 420 mil novos casos de câncer, sendo 49% no sexo feminino e 51% no masculino. Nas mulheres o câncer de mama (CM) é o mais incidente (29,5%), seguido pelo câncer colorretal (9,4%), colo do útero (8,1%) e pulmões (6,1%).

Tratando-se especificamente do CM, segundo dados do INCA (BRASIL, 2017) estima-se que ocorra mais de 59,7 mil novos casos, representando 56,3 casos para cada 100 mil mulheres. A região Sul apresentará maior incidência (73,07/100 mil), seguida pelo Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil), Nordeste (40,36/100 mil) e Norte (19,21/100 mil). No Ceará, CM é a neoplasia mais incidente com 100,36 casos/100 mil na capital e 47,5/100 mil em todo o estado. A mortalidade é de um terço do valor da incidência, aproximadamente (BRASIL, 2017).

Com o aumento da prevalência e incidência do câncer na população mundial, a carga dessa doença nos sistemas de saúde e o impacto financeiro que ele representa são cada vez maiores devido a perda da produtividade por mortes prematuras (NAJAFI *et al.*, 2016), aumento no número de hospitalizações (JINJUVADIA *et al.*, 2017) e aumento da mortalidade (LOPES *et al.*, 2017).

O CM tem como fatores de risco a idade, tempo e uso de anticoncepcionais orais, idade do primeiro parto, idade em que ocorreu a menopausa, tempo de reposição hormonal, histórico familiar da doença, amamentação e tabagismo (SUN *et al.*, 2017), sendo que cerca de 5-10% dos CM são de origem hereditária, principalmente com mutações dos genes BRCA1-2 (NEIL-SZTRAMKO *et al.*, 2017).

Apesar do impacto da hereditariedade no desenvolvimento do CM, cerca de 35% dos cânceres podem ser atribuídos a fatores relacionados à dieta. Sendo assim, os nutrientes e alguns compostos bioativos podem agir como fatores de risco ou de proteção para o desenvolvimento das neoplasias (ESCRICH; SOLANAS; MORAL, 2014).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O CM pode ter origem em diversos compartimentos da mama, sendo a maior incidência nos ductos mamários (neoplasia ductal) ou nas glândulas mamárias (neoplasia lobular) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). A **Figura 1** descreve a anatomia e os compartimentos mamários que podem desenvolver o câncer.

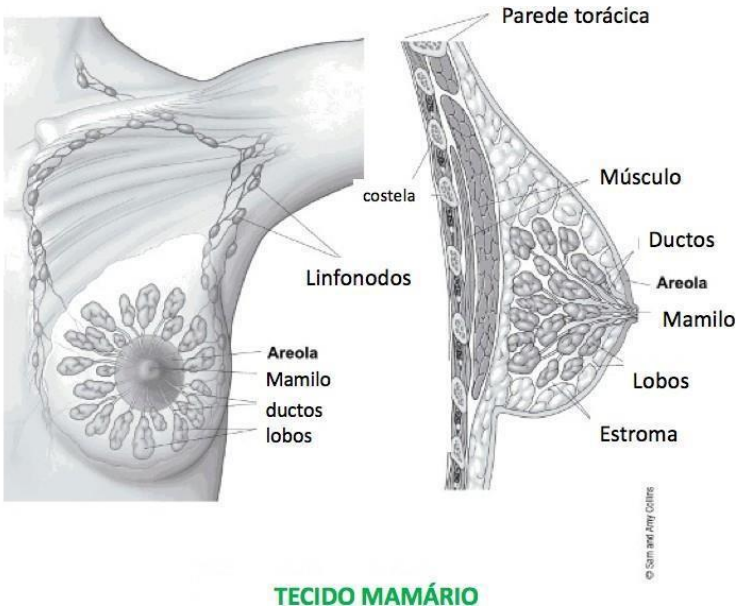


Figura 1. Anatomia e compartimentos mamários. Imagem extraída e traduzida do site *American Cancer Society*, disponível em: *https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast- cancer.html* acesso em 18/12/18.

Em condições fisiológicas as células mamárias produzem estrógenos E1 (estrona), E2 (17β-estradiol) e E3 (estriol). O local no qual são produzidos e os mecanismos de ação desses hormônios variam consideravelmente entre os períodos pré e pós-menopausa. Na pré-menopausa os ovários produzem E1 e E2, estimulados pelos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) em forma de andrógenos, que serão convertidos a estrógenos pela ação da enzima aromatase, tendo o tecido adiposo função mínima neste período. O E3 é produzido somente na gestação (LIANG; SHANG, 2013; VONA-DAVIS; ROSE, 2013). Entretanto, no período da pós-menopausa o tecido adiposo adquire papel relevante na síntese de estrógenos, também por via da ativação da aromatase. As glândulas adrenais produzem andrógenos, que por ação dessa enzima sintetizada no tecido adiposo são convertidos em estrógenos (MACCIO; MADEDDU, 2012). Estes agem nos ductos mamários e no desenvolvimento dos lóbulos por meio de ligação a receptores específicos de estrógenos do tipo α e β (REα e REβ).

Especialmente o REα é responsável pela regulação de vários genes envolvidos na apoptose, proliferação celular, angiogênese e também na capacidade de adesão celular (LIANG e SHANG, 2013). A conexão entre estrógenos e tecido adiposo adquire particular relevância na carcinogênese quando o estímulo hipertrófico e hiperplásico dos adipócitos,

típico do excesso de peso, ocorre no período da pós-menopausa (VONA-DAVIS; ROSE, 2013).

O desenvolvimento do câncer inclui algumas etapas fundamentais que compreendem: a resistência à morte celular, indução à angiogênese, estímulo à metástase/invasão, capacidade de escapar de supressores de crescimento tumorais, a resistência a mecanismos de inibição de contato celular, permitindo as células tumorais a se justapor, disfunção das vias de fator de crescimento tumoral beta (TGF-β), promoção de malignidade, aumento das substâncias pró-inflamatórias, desbalanço das vias energéticas celulares e capacidade de escapar do processo de remoção mediado pelo sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Durante o desenvolvimento tumoral ocorre diferenciação das células normais em um processo que envolve várias etapas, em que a participação de genes supressores e de estimulação tumoral é fundamental. Este processo pode ser desencadeado por predisposições genéticas adquiridas ou herdadas. As hereditárias se dão, no caso do CM, pela alteração dos oncogenes BRCA-1 e BRCA-2. A adquirida ou esporádica ocorre quando há superexpressão, ativação ou até amplificação de múltiplos genes envolvidos no complexo processo de proliferação e apoptose celular, angiogênese e invasão tecidual, os quais podem estar intimamente relacionados à cascata de sinalização modulada pelos estrógenos (MESTER e REDEUILH, 2008; PELEKANOU e LECLERCQ, 2011).

De todos os tipos de CM, 75% apresentam receptores hormonais positivos (Receptor de estrógeno - RE+, e Receptor de progesterona - RP+) e cerca de 15-20% são positivos para HER2 (Receptor de fator de crescimento epitelial do tipo 2). Antes do tratamento com o fármaco trastuzumab o prognóstico de pacientes com HER2+ era bastante conservador, se alterando para um cenário mais favorável após a inclusão dessa substância no tratamento (SULLIVAN, CC; LOPRINZI, CL; HADDAD, 2018). Aproximadamente 15% das mulheres com CM são negativas para esses três marcadores, chamadas de triplo negativo, formando um grupo bem heterogêneo em relação a classificação e posterior tratamento (TÖKÉS *et al.*, 2019). O subtipo RE+ é mais frequente em mulheres no período pós-menopausa, enquanto o subtipo RE- e de maior agressividade está associado à ocorrência no período pré-menopausa (MOLFINO *et al.*, 2016). Atualmente, a classificação dos tumores de mama também inclui o marcador Ki67, que é uma proteína nuclear que indica proliferação celular (TÖKÉS *et al.*, 2019).

O tecido tumoral é classificado segundo o seu tamanho (T), comprometimento de linfonodos (N) e presença de metástase (M), compondo o sistema TNM proposto pelo

American Joint Committee on Cancer - AJCC e a União Internacional de Controle de Câncer- UICC, o qual é atualizado a cada 6 a 8 anos (AJCC, 2010). A partir deste estadiamento anatomopatológico as pacientes são classificadas por estadiamento clínico (**Figura 2**). A caracterização em tumor *in situ* se dá quando a neoplasia está em fase inicial e, sem invasão da membrana basal subepitelial. Os tumores T1 possuem ≤ 2 cm, enquanto os T2 se encontram na faixa que varia de > 2 cm e ≤ 5 cm, T3 > 5cm e T4 pode apresentar qualquer tamanho, contanto que tenha extensão direta com a parede torácica, pele ou ambas, podendo ser também incluído o câncer inflamatório de mama (tipo mais raro). Em relação ao comprometimento linfonodal, N0 representa ausência de comprometimento de linfócitos, N1 ausência de metástase para linfonodos axilares, N2 metástase na região da cadeia mamária, N3 metástase aparente na cadeia mamária e na região axilar. Em relação a metástases à distância, M0 representa ausência de metástase e M1 presença de metástase. De acordo com INCA (2006), mulheres portadoras de neoplasia mamária costumam apresentar tumores com estádio I (18%), estádio II (56%), estádio III (20%) e estádio IV (6%), quando admitidas pela primeira vez na rede pública de saúde.

O AJCC em 2018 atualizou as diretrizes de estadiamento tumoral e clínico para o CM, incluindo no estadiamento não somente o tamanho do tumor como definidores clássicos, mas também os receptores RE, RP, HER2 e ki67, deixando o processo de classificação mais complexo e específico (HORTOBAGYI *et al.*, 2017).

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T0-1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0-2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
IIIB	T4	N0-2	M0
IIIC	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	qualquer N	M1

Figura 2. Relação entre os estadiamentos anatomopatológicos TNM e Clínicos (0-IV), segundo o sétimo manual de estadiamento em câncer (2010) do AJCC. Tis=tumor in situ. T=tamanho tumoral, N=comprometimento de linfonodos, M=metástase a distância. Figura disponível em: *https://cancerstaging.org/referencestools/quickreferences/Documents/BreastMedium.pdf*.

1.3 EIXO INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E CÂNCER DE MAMA

A inflamação se caracteriza pela ativação da resposta imune celular visando a defesa do organismo contra antígenos (bactérias, vírus, protozoários, etc.), e agentes físicos e químicos danosos ao corpo, com consequente eliminação e reconstrução de tecidos agredidos (CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016). Classicamente, há a inflamação aguda com presença típica de dor, rubor, calor e edema. A estimulação de tipos celulares, principalmente do sistema inato, associada à secreção de citocinas são extremamente intensas. Quando esse processo se prolonga por dias ou semanas, causando mais injúrias aos tecidos do que eliminação do agente agressor, ela pode se tornar crônica. Na inflamação crônica existe um outro padrão de tipos celulares envolvidos, com desbalanço entre destruição e recuperação tecidual. Em situações de doença, tais como no excesso de peso, neoplasias, doenças cardiovasculares entre outras, há também a inflamação crônica de baixa intensidade. Essa é caracterizada por liberação prolongada e contínua de citocinas produzidas não somente por células do sistema imune como por tecidos periféricos e tecido adiposo. O processo inflamatório envolve o aumento da permeabilidade dos capilares e maior sinalização das

células do sistema imune inato (monócitos, neutrófilos, entre outros) para migrarem para os tecidos afetados (CALDER, 2013). Esses mesmos autores elencam as citocinas MCP-1, IL-1β, TNF-α, IL-10 e IL-6 como os principais biomarcadores do padrão inflamatório em estudos de associação (CALDER *et al.*, 2013).

Devido as associações entre inflamação e câncer começou-se a estudar o papel do fator nuclear kappa B (NF-kB) na estimulação de citocinas inflamatórias. Esse mediador de sinalização celular desempenha o papel de fator de transcrição em praticamente todo tipo de célula, ativando as sinalizações celulares de proliferação, de produção e liberação de citocinas inflamatórias (BROMBERG; WANG, 2009).

Dentre os principais sinalizadores está a proteína quimioatrativa de monócitos - MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*), cuja principal função é atrair células, principalmente monócitos, para o sítio da inflamação tecidual, iniciando a resposta inflamatória ou a exacerbando. Sua expressão está aumentada por meio da ativação do fator nuclear kB. Tanto a MCP-1 quanto o seu receptor CCR2 estão superexpressos em tumores, tais como o CM (LUBOWICKA *et al.*, 2018).

A interleucina 1 beta (IL-1β) é um dos principais sinalizadores que propagam a cascata inflamatória, estimulando outras células a perpetuar a inflamação. Essa citocina, em altas concentrações, está associada com o desenvolvimento de neoplasias e proliferação celular (JIMÉNEZ-GARDUÑO *et al.*, 2017).

De modo semelhante, a interleucina 6 (IL-6) está comumente relacionada com a tumorigênese e o crescimento celular, conforme demonstrado por diversos estudos abordando a associação entre altas concentrações de IL-6 com CM e outras neoplasias (BROMBERG; WANG, 2009; KAWANISHI *et al.*, 2017; MASJEDI *et al.*, 2018).

Secretado principalmente por macrófagos, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina envolvida principalmente no aumento da resposta inflamatória e no dano celular. Com o crescente número de estudos mostrando a associação entre câncer e inflamação também se verificou o seu papel deletério, mostrando a relação entre altas concentrações de TNF- α com tumores maiores, mais agressivos e invasivos (KAWANISHI *et al.*, 2017).

Classicamente conhecida como citocina anti-inflamatória, a interleucina 10 (IL-10) inibe a expressão gênica de células T e de macrófagos, resultando em menor liberação de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1β, IL-12, IL-18, TNF-α). Dentre seus principais papeis estão a estimulação e diferenciação de linfócitos tipo B e a secreção de anticorpos, inibição do NF- kB, otimização das vias apoptóticas, estimulação de células *Natural Killers*

(NK) e T efetoras, que agem na remoção de células infectadas por vírus ou células neoplásicas. Devido as suas propriedades anti-tumorigênicas estudos têm mostrado sua relação com a proteção ao câncer ou diminuição do tamanho tumoral (HAMIDULLAH; CHANGKIJA; KONWAR, 2012).

O exato mecanismo que liga a inflamação crônica e CM ainda não é claro. Entretanto, acredita-se que mudanças nas vias de sinalização das células imunes infiltradas no tecido mamário possam ser responsáveis pela alteração do perfil inflamatório local. De forma fisiológica essas células atuam no tecido mamário colaborando com o desenvolvimento e remodelação das glândulas mamárias e, por motivos ainda não esclarecidos, esse equilíbrio é interrompido e o quadro inflamatório se torna crônico, podendo contribuir com o risco aumentado de CM (BHATELIA; SINGH; SINGH, 2014).

De modo paralelo à resposta inflamatória, o estresse oxidativo também está presente no CM. O dano oxidativo às moléculas, tais como o DNA e macromoléculas, pode ser um dos mecanismos que favorecem a ruptura da homeostase celular (PANDE *et al.*, 2012). Moléculas com alta capacidade oxidativa são derivadas do metabolismo energético e, normalmente, o organismo apresenta mecanismos de defesa capazes de amenizar tal agressão, porém, estímulos associados ao envelhecimento e mudanças no padrão alimentar podem induzir e/ou agravar o acúmulo progressivo de danos ao nível celular (MOLONEY; COTTER, 2018). Esses por sua vez, podem atingir o núcleo celular causando agressões no DNA de genes pró-tumorigênicos e também anti-tumorigênicos. Caso ocorra nesse último, os danos podem ser ainda mais graves, pois os genes anti-tumorigênicos são capazes de reparar rupturas nos processos de transcrição e tradução (CHIO; TUVESON, 2017). Os danos exercidos pelo estresse oxidativo podem ser em si os principais iniciadores da tumorigênese (GALADARI *et al.*, 2017), assim como podem se associar ao um ambiente cronicamente inflamado, intensificando o processo (CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016).

Diante da importância da oxidação no dano ao DNA estudos têm se proposto a estudar essa relação. A adição de uma partícula hidroxil (OH) nas moléculas de DNA resulta em alterações associadas à geração do 8-hidroxi-2’deoxiguanosina (8-OHdG) que têm sido descrito como elevada em pacientes com CM, quando comparados à mulheres livres de neoplasia, e sua concentração variam conforme o aumento do estadiamento (HIMMETOGLU *et al.*, 2009; KARIHTALA *et al.*, 2011; MANNI; EL-BAYOUMY; THOMPSON, 2018; NOUR ELDIN *et al.*, 2019).

Nos processos inflamatórios e oxidativos, intimamente relacionados, são gerados vários produtos de oxidação e dentre esses o processo de peroxidação lipídica tem sido

amplamente estudado no contexto das doenças crônicas, incluindo o CM. Classicamente, o malondialdeído e outros produtos de oxidação lipídica avançada podem ser identificados por métodos como de avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) cujo custo e praticidade é menor que os métodos cromatográficos. Estudos mostram que pacientes com câncer de mama apresentam valores superiores de TBARS no decorrer do tratamento, quando aumentaram a ingestão de carne vermelha, óleos vegetais, ovos e laticínios (ROCKENBACH *et al.*, 2011).

Embora o próprio CM seja capaz de induzir e manter ativa diversas vias inflamatórias e oxidativas que favorecerão o processo de crescimento tumoral, a presença de outras doenças de base inflamatória e oxidativa podem agravar esse cenário, favorecendo a recidiva tumoral e reduzindo o prognóstico clínico das pacientes. Nesse contexto, já se conhece o impacto negativo do aumento da adiposidade como fator contribuinte para a manutenção da inflamação subclínica crônica (CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016; DENG *et al.*, 2016; ELINE; ERARD; BROWN, 2017). O excesso de peso secundário à mudança do padrão alimentar rico em alimentos hipercalóricos, hiperlipídicos e aumento do sedentarismo contribuem para a elevação da inflamação e de mecanismos que perpetuam sinalizadores de proliferação de células mamárias. De forma bem estabelecida, o aumento do tecido adiposo envolve a liberação de vários mediadores do sistema imune tanto no adipócito, quanto ao nível sistêmico (MONK *et al.*, 2014). Especialmente em mulheres com CM, sabe-se que a inflamação desencadeia sinais pró-carcinogênicos que favorecem o desenvolvimento do subtipo de câncer de mama (RE+ e RP+), cuja incidência é maior em pacientes com maior idade e adiposidade (MONK et al., 2014). No CM, mulheres que já apresentavam sobrepeso no momento do diagnóstico tiveram maior risco de ter um pior prognóstico e maior risco de recidiva quando comparadas com pacientes eutróficas (BARONE *et al.*, 2016).

No tecido adiposo os ácidos graxos serão usados como substrato pela ciclooxigenase (COX-2) e induzirão a maior ativação da NF-kB, levando à produção de citocinas inflamatórias ao nível do microambiente (**Figura 3**). O aumento dessas citocinas promoverá maior ativação da aromatase pelos adipócitos, convertendo andrógenos em estrogênio, estimulados pela alta produção de citocinas IL-1β, PGE2 (prostaglandina E2) e TNF-α, com consequente estímulo para as células cancerígenas. No âmbito sistêmico, a resistência à insulina presente em situações de obesidade causará aumento de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), as quais também são metabólitos que podem

promover carcinogênese. A disfunção sistêmica causada pela resistência à insulina, a lipotoxicidade (com aumento de leptina circulante e diminuição de adiponectina) e constante aumento de ácidos graxos livres promoverão elevação das citocinas pró-inflamatórias. Estes fatores estimularão as células adiposas a entrarem em apoptose, se tornarem "*crown-like*", perpetuando a cascata inflamatória e aumentando a síntese de estrógeno, que agem como constante estímulo neoplásico no microambiente e ao nível sistêmico (IYENGAR; HUDIS; DANNENBERG, 2015).

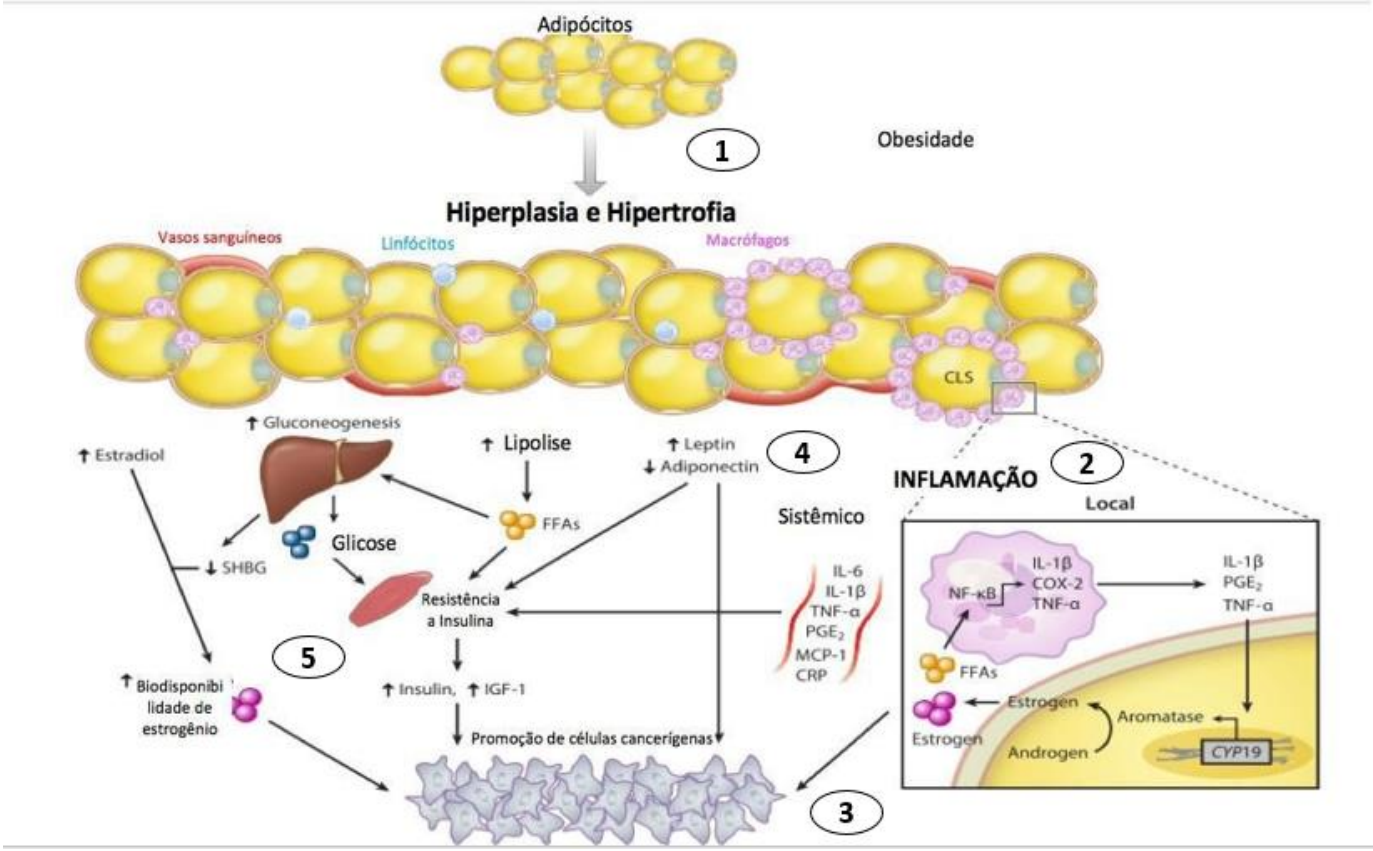


Figura 3. Visão *in situ* e sistêmica da interação entre peso e inflamação. 1-Hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, secundária a uma alimentação hipercalórica. 2- Aumento da inflamação local devido a maior infiltração de células do sistema imunes e morte dos macrófagos, tornando-se células crown-like. 3- Maior conversão de andrógenos em estrógenos pela enzima aromatase expressa nos adipócitos. O ambiente altamente rico em compostos inflamatórios e a expressão elevada de estrógenos contribuem para o estímulo pró-oncogênico exarcebado. 4- Aumento da adipocidade resulta no desbalanço das adipocinas, desregula também o metabolismo glicídico e colabora com o aumento da resistência à insulina. 5- Desbalanço das vias energéticas, maior disponibilidade de estrogênio e crescente aumento da inflamação sistêmica contribuem para a manutenção de um status favorável ao desenvolvimento tumoral mamário. Abreviações: CLS- células "crown- like", COX-2- ciclooxigenase 2, CRP- proteína C reativa, FFAs- ácidos graxos livres, IGF-1- fator de crescimento semelhante a insulina 1, IL-1 - interleucina 1 , IL-6, interleucina 6, MCP-1, proteína quimioatrativa de monócito 1, PGE2- prostaglandina E2, SHBG- globulina ligadora de hormônios esteroides, TNF-α- fator de necrose tumoral . Figura traduzida e adaptada de IYENGAR; HUDIS; DANNENBERG (2015).

O papel da inflamação no câncer pode ultrapassar o limiar da tumorigênese e de piora de prognóstico. A perda de apetite típica de pacientes com câncer avançado pode ser provocada por citocinas pró-inflamatórias entre elas as interleucinas 1β, 6 e TNF-α, que são secretadas tanto pelas células tumorais, quanto pelo sistema imune (AOYAGI *et al.*, 2015). Esse processo tem forte associação com a caquexia, que atualmente é considerada o principal evento clínico que leva o paciente oncológico a piora do prognóstico e à morte. A caquexia no câncer é definida como resultado da inflamação sistêmica, perda involuntária de massa muscular por proteólise e balanço energético negativo (FEARON *et al.*, 2011). Em uma coorte com duração de 9 anos, Villaseñor et al. (2012) observaram que em 471 mulheres com diagnóstico de CM, 16% desenvolveram caquexia e a sarcopenia associada a esse evento foi considerada como fator independente na mortalidade das pacientes.

Kubo *et al.* (2017) analisaram tomografias de 99 pacientes que vieram à óbito por CM. Houve diferença entre os estadiamentos tumorais (de T1 a T4) em relação à quantidade muscular, sendo pior conforme aumentava o estadiamento. Ao longo dos 12 meses, entretanto, independente do estadiamento, a massa muscular diminuiu em todas as pacientes, demonstrando que havia um possível processo de caquexia em curso ao longo da doença. Blauwhoff-Buskermollen *et al.* (2017) estudaram o impacto de diferentes métodos de avaliação de perda de massa muscular, tais como tomografias, área muscular do braço e bioimpedância elétrica (BIA). Eles encontraram que apesar desses distintos métodos resultarem em diferentes percentagens de massa muscular, todos foram capazes de diagnosticar a sarcopenia no contexto do câncer.

1.4 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Considerando que o CM apresenta uma base inflamatória e oxidativa e que fatores ambientais e, particularmente, a dieta pode explicar cerca de 30% dos casos de câncer, tem sido de interesse científico avaliar nutrientes e compostos bioativos capazes de modular vias metabólicas e moleculares a favor de prognósticos mais positivos (KUBOTA *et al.*, 2015) e de tumores e melhora do estado nutricional de pacientes com neoplasias. Entretanto, não há consenso sobre a correta dosagem de suplementação ou de ingestão alimentar e nos *guidelines* os níveis de evidência são limitados (LAVIANO *et al.*, 2013).

Biologicamente o ácido graxo poli-insaturado α-linolênico (ALA, 18:3 n-3) é um

ácido graxo essencial, ou seja, não há síntese endógena e, portanto, deve ser fornecido por meio da dieta e/ou suplementos. As principais fontes alimentares de ALA são linhaça e óleo de canola. Ele é o precursor de outros ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa, como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n- 3), ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3) e ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3). Os peixes de águas frias, tais como a sardinha, o atum e o salmão são fontes alimentares desses três ácidos graxos. O aumento na ingestão desses alimentos reflete a longo prazo em maior proporção desses compostos nos lipídios plasmáticos, nos leucócitos, eritrócitos, plaquetas e até no leite humano. Estudos mostram que a conversão de ALA em EPA (0,2%) ocorre em seres humanos, porém é limitada e a sua consequente conversão à DPA é de 0,13% e em DHA é ainda mais reduzida (0,05%). Em mulheres essa taxa é um pouco maior do que em homens, possivelmente por influência do estrogênio e menor metabolização desses ácidos graxos pela β-oxidação quando comparado com os homens (BURDGE, GC. CALDER, 2005). Estima-se que o EPA e DHA contribuam com menos de 0,05% do total calórico diário, enquanto os ácidos graxos derivados do ácido linoleico (LN, 18:2, n-6), o ácido araquidônico – ARA, contribua com 8%, aproximadamente (HINTZE; TAWZER; WARD, 2016).

Nas membranas celulares os ácidos graxos se incorporam na forma glicofosfolipídica, mudando a conformação e fluidez dessa membrana, conforme a composição e saturação de sua cadeia carbônica (LIU; MA, 2014). Além da baixa capacidade de biotransformação de ALA em EPA, DHA e DPA os papéis biológicos desses ácidos graxos são fortemente influenciados pelo conteúdo de LN presente na dieta. Estima-se que nas dietas consumidas antes da Revolução Industrial essa proporção era de 0,8:1 (LN:ALA), mas, atualmente, as dietas ocidentais apresentam uma proporção aproximada de 17:1 (LN:ALA), devido principalmente ao alto consumo de óleos vegetais ricos em n-6 (óleos de soja, girassol, etc.) e baixo consumo de peixes (sardinha, atum, salmão) (HINTZE; TAWZER; WARD, 2016; MARTIN *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos n-6 e n-3 competem pelas enzimas envolvidas nas reações de desaturação e elongação em ácidos graxos de cadeia muito longa (**Figura 4**), e apesar dessas enzimas possuírem uma afinidade maior pelos ácidos n-3, a alta concentração de LN na dieta é fundamental para definir a sua conversão por essas enzimas (MARTIN et al., 2006). O LN ao ser convertido em ARA, será posteriormente substrato para a formação de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclinas pela COX e em leucotrienos e lipoxinas de série par pelas lipoxigenases (LOX). Essa via é relacionada com maior inflamação, angiogênese e

proliferação tumoral, enquanto a conversão de ALA para EPA e DHA gera prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclinas de série ímpar pelas COX e leucotrienos e lipoxinas pelas LOX, tendo efeito oposto aos metabólitos produzidos pelo LN (LENIHAN-GEELS; BISHOP; FERGUSON, 2016).

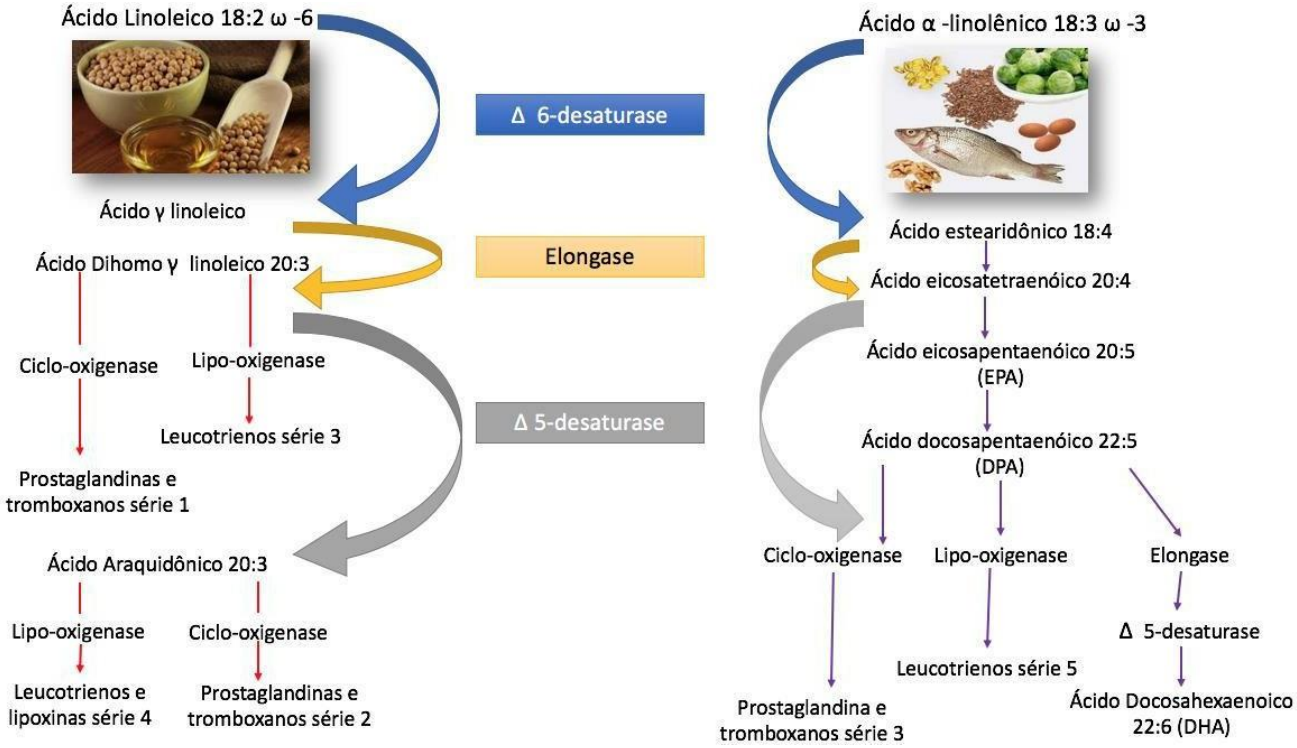


Figura 4. Metabolismo dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 e seus principais produtos. Figura traduzida e adaptada de HUERTA-YEPEZ et al (2016); CALDER (2016).

Concomitante a mudança do padrão alimentar rico em ácidos graxos ômega 6, o aumento do sedentarismo e reduzida ingestão de alimentos antioxidantes (vitamina C, Vitamina E, β-caroteno, vitamina A, selênio, e n-3), assim como alta ingestão de gorduras tipo *trans* foram relacionadas com aumento do estresse oxidativo avaliado por meio do conteúdo de F2- isoprostano em mulheres na pré-menopausa, que apresentaram maior risco de CM (ANDERSON *et al.*, 2016). Tsai *et al.* (2017) descreveram que somente o DHA, entre todos os ácidos graxos avaliados, teve impacto nas reações de oxidação celular, tendo exercido ação positiva sobre supressores tumorais por meio da ativação das vias de sinalização celular PI3K/Akt.

A interação entre o EPA e DHA envolve a ativação de vias diretas e indiretas na ativação da inflamação, que incluem as resolvinas, protectinas e lipoxinas, as quais são todas

derivadas dos n-3 dietéticos produzidas via COX e LOX (ZHENG *et al.*, 2015). Especificamente as resolvinas são sintetizadas através das LOX tendo como substratos os n-3 (**Figura 5)**. Acredita-se que ela esteja envolvida nos mecanismos que auxiliam os neutrófilos a fagocitar células mortas ou que entraram em apoptose. Quando esse mecanismo está desregulado os neutrófilos não são capazes de realizar plenamente suas funções e permanecem ativamente liberando citocinas, tais como TNF-α e IL-6. A liberação contínua de agentes pró-inflamatórios está relacionada aos processos de tumorigênese (MORO *et al.*, 2016). Em um estudo com ratos as concentrações de IL-6, PCR (proteína C reativa) e TNF-α diminuíram com uma dieta rica em n-3, além de prevenir o acúmulo de triacilglicerois no tecido adiposo visceral, enquanto os ácidos n-6 mostraram efeito oposto (ZHENG et al., 2015).

Lenihan-Geels *et al*. (2016) avaliaram o impacto da razão n- 6/n-3 em animais saudáveis e encontraram que aqueles com dietas ricas em n-3 tinham menores valores de citocinas inflamatórias. O aumento dessa razão ou alta ingestão de n-6 foram associados com ganho de peso, tanto em estudos em animais como em humanos, enquanto os ácidos graxos n- 3 foram associados à perda de peso (SIMOPOULOS, 2016). Já os ácidos graxos saturados palmítico (16:0) e esteárico (18:0) induzem inflamação e lipotoxicidade em macrófagos, hepatócitos e adipócitos, um consumo de 2g/dia de ácidos graxos n-3 diminuiu a concentração plasmática de alanina aminotransferase, triacilglicerois e TNF-α em pacientes com esteatose hepática não alcoólica, evidenciando um possível papel protetor dos n-3 no desenvolvimento da lipotoxicidade (HUANG *et al.*, 2016).

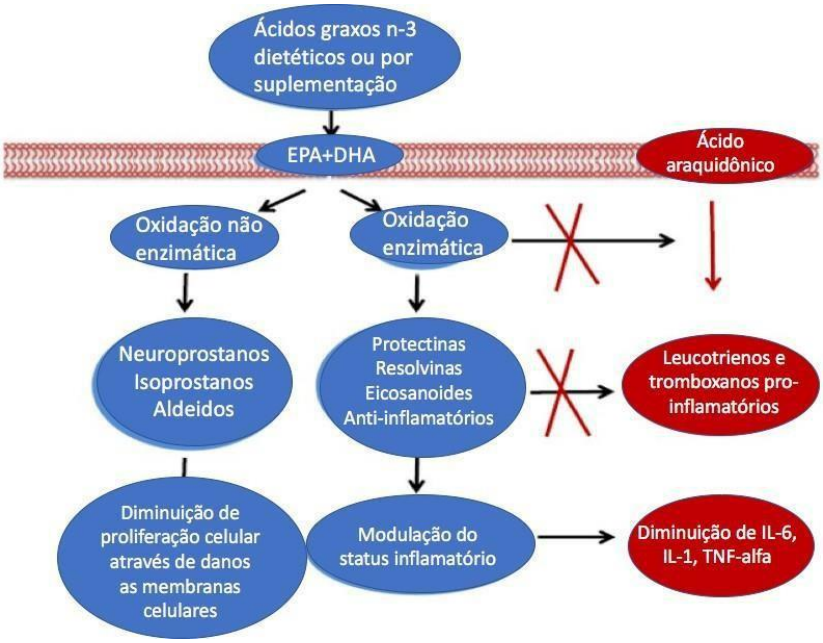


Figura 5. Participação dos ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 na incorporação das membranas celulares e sua participação na inflamação. Traduzida e adaptado de MOLFINO et al., (2016). DHA- ácido docosahexaenoico, EPA- ácido eicosapentaenoico, IL- interleucina. TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa.

O tamanho tumoral também tem sido inversamente correlacionado com a maior incorporação de n-3 e seus metabólitos EPA, DHA e DPA nas membranas celulares. Tsoukas *et al.* (2015) observaram que ratos com câncer colorretal que tiveram menor tamanho tumoral foram aqueles alimentados com uma dieta rica em n-3 (ALA), quando comparados com aqueles com maior incorporação de metabólitos de n-6 nas membranas. A suplementação foi fornecida por meio de ração enriquecida equivalente a duas porções de nozes/dia para humanos.

Em um estudo in *vitro* com células de tumores mamários, Mansara *et al.* 2015) encontraram que a baixa razão n-6/n-3 associou-se aos genes supressores de tumor, enquanto nas altas razões observou-se estímulo para a proliferação celular.

Em estudo com camundongos alimentados com ração enriquecida com ALA, Vara-messler *et al.* (2017) observaram que naqueles animais com dieta rica nesse ácido graxo houve maior infiltração de linfócitos, maior apoptose e menor mitose no tecido mamário tumoral, do que no grupo controle.

Kuriki *et al.* (2007) observaram associação inversa entre risco de desenvolvimento de CM e composição de ácidos graxos n-3 nas membranas eritrocitárias, assim como associação direta entre concentração de n-6 nessas membranas e risco para CM.

Na meta-análise de Camargo *et al.* (2015) observou-se que houve redução de IL- 6 e aumento de albumina após suplementação de n-3 (0,6 g/dia por 9 semanas em pacientes com câncer colorretal), contudo não encontraram redução de TNF-α, IL-1β e PCR. Outro estudo realizado por Mocellin *et al.* (2013) mostrou que a suplementação de 2 g/dia de n-3 em pacientes sob tratamento quimioterápico foi capaz de diminuir o valor da PCR, melhorar o perfil de ácidos graxos sanguíneos, mudar a razão PCR/albumina e prevenir a perda de peso durante o tratamento.

Também tentando compreender a relação inflamação e ingestão de ômega n-3 e n-6 no câncer de mama, Basset *et al.* (2016) observaram que houve mais risco de CM em mulheres que tinham um alta ingestão de ácidos graxos saturados e tumores positivos RE e RP, e tumores RE-/RP- se associaram com n-6, apresentando os ácidos DPA, DHA e EPA associação inversa com tamanho tumoral.

Diante disso, parece que uma dieta rica em n-3 exerça um papel positivo nos processos oxidativos e inflamatórios em mulheres com CM diminuindo as chances de ter um ambiente favorável ao crescimento tumoral exacerbado. O estadiamento clínico reflete o grau invasivo e agressivo do câncer, o qual determina a conduta terapêutica. Um olhar sobre o papel dos ácidos ômega 3 nesse estadiamento pode contextualizar a futura utilização terapêutica desse nutriente, além do estímulo ao consumo de alimentos fonte nas estratégias preventivas e manejo do paciente com CM.

2. OBJETIVO

Avaliar o impacto do estadiamento tumoral na associação dos ácidos graxos ômega 3 biodisponíveis no plasma e nas membranas eritrocitárias com o estresse oxidativo e inflamação em mulheres com neoplasia mamária.

3. METODOLOGIA

3.1 PROJETO CANCER DE MAMA

O presente trabalho faz parte do projeto intitulado "*Obesidade e câncer de mama: avaliação dos fatores de risco associados ao excesso de peso e tecido adiposo*" aprovado pelos comitês de ética e pesquisa da Faculdade de Saúde Pública e do Hospital Geral de Fortaleza (**Anexo 4**),

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo caso-controle, observacional e de caráter analítico. Pacientes do sexo feminino com diagnóstico anatomopatológico de neoplasia mamária (**Caso**) foram selecionadas no ambulatório de Mastologia do Hospital Geral de Fortaleza- HGF (Fortaleza, Ceará). Mulheres sem diagnóstico de neoplasia mamária (**Controle**) foram selecionadas no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia da mesma instituição. O período de seleção e coleta de dados das pacientes Caso-Controle ocorreu no período de maio de 2011 a agosto de 2012. O presente estudo pretende analisar o padrão habitual da ingestão alimentar das mulheres, por isso nenhuma recomendação de ingestão de alimentos fontes de n-3 ou n-6 foi incentivada, nem a sua suplementação.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A amostra foi selecionada por conveniência, de forma não-probabilística e consecutiva. O grupo de estudo esteve presente em ambos os laboratórios do HGF para recepção e coleta dos dados das pacientes.

Após suspeita de neoplasia de mama pelo médico, as pacientes do grupo Caso eram encaminhadas ao ambulatório de Mastologia do HGF. Uma equipe de pesquisadores, em parceria com a equipe do ambulatório, tinha acesso ao fluxo de entrada dessas pacientes e as convidavam para participar da pesquisa. Uma vez assinado o termo de consentimento de forma voluntária, elas eram recebidas em visita para o preenchimento dos questionários socioeconômico, medidas antropométricas e coleta de sangue. Por desconhecer ainda a confirmação do diagnóstico de câncer de mama, somente após a realização de biopsia e confirmação do laudo aquelas que possuíam neoplasia foram efetivamente incluídas no grupo Caso.

De forma semelhante pacientes que possuíam consulta de rotina ou prevenção no ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HGF eram convidadas a participar da pesquisa e compor o grupo Controle.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para se tornarem elegíveis no grupo Caso, as mulheres deveriam ser diagnosticadas clínica e anatopatologicamente com neoplasia mamária, de estadiamento tumoral T1 a T3 e clínico de 0 a III c, sem tratamento antineoplásico prévio e com índice Karnofsky superior a 70.

O índice de Karnofsky é um “padrão-ouro” para avaliar a autonomia de pacientes oncológicos para realizar seus cuidados pessoais. Trata-se de uma escala que varia de 0 a 100, em que os valores de 100-80 indicam que o indivíduo está apto a realizar atividades de rotina e cuidar de si mesmo, 70-50 inapto para o trabalho e 40-0 inapto a cuidar de si mesmo (KARNOFSKY et al., 1948) (**Anexo 5**).

Para o grupo controle foram elegíveis mulheres livres de qualquer neoplasia, avaliadas por meio de médico colaborador do estudo e consulta a prontuários e exames disponíveis no HGF.

3.5 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Pacientes com outras DCNTs não controladas, de doenças transmissíveis, com problemas neurológicos e/ou psiquiátricos, uso de suplemento vitamínico e presença de metástases foram consideradas fora do perfil desejável para o estudo e não foram incluídas. As informações foram obtidas a partir de realização de anamnese clínica pelos pesquisadores e consulta aos prontuários das pacientes. Nenhum aspecto do hábito alimentar foi considerado como critério para não inclusão.

3.6 RISCOS E BENEFÍCIOS

O presente estudo teve caráter observacional e não de intervenção, por isso o risco aos pacientes foi considerado mínimo. Todas as pacientes foram convidadas a ler e assinar o Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**) e somente após a assinatura do documento os dados foram coletados. As pacientes puderam se retirar do estudo e manifestar desistência a qualquer momento, sem qualquer comprometimento com seu tratamento antineoplásico.

3.7 CÁLCULO AMOSTRAL

Com base nos cálculos proposto por HULLEY et al (2008) e utilizando β= 0,10 e α= 0,05 (bilateral) realizou-se o cálculo amostral (**Quadro 1**), obtendo-se n mínimo de 82 pacientes tendo como variáveis de interesse citocinas inflamatórias, tamanho tumoral e oxidação. Para o grupo controle calculou-se a partir dos dados de (MACCIÒ *et al.*, 2010) obtendo-se n mínimo de 96 pacientes.

Quadro 1. Relação entre os artigos pesquisados para realização do cálculo amostral.

Artigo	Variáveis analisadas	Correlação	Amostra necessária
(MADEDDU *et al.*, 2014)	Tamanho tumoral versus IL-6	0,427	62
	Comprometimento linfonodal versus IL-6	0,583	38
	Estadiamento tumoral versus IL-6	0,687	25
(GOSWAMI *et al.*, 2009)	Substâncias antioxidantes versus estadiamento	-0,486	62
(MACCIO et al., 2010)	Tamanho tumoral versus oxidação celular	0,353	82

Valores adotados: α= 0,05, β=0,10. IL= interleucina

3.8 GRUPOS DE ESTADIAMENTO

No presente estudo as pacientes Caso foram distribuídas em dois grupos, segundo o estadiamento clínico: <EC - formado por pacientes que apresentaram tumores mamários menores que 5 cm e que não apresentaram comprometimento de linfonodos (EC 0 a II) e >EC– incluiu mulheres com tumores ≥ 5cm e comprometimento de linfonodos (EC IIa a IIIc). Ambos os grupos sem metástases.

3.9 PERFIL SOCIOECONÔMICO E CLÍNICO

As variáveis socioeconômicas (estado civil, etnia, escolaridade, renda familiar *per capita* e idade) das pacientes foram obtidas por meio de questionário padronizado e avaliação direta (**Anexo 2**). Em consulta aos prontuários das pacientes, assim como por meio de entrevista presencial com auxílio de médico foram obtidas as histórias clínicas avaliando-se: estado de menopausa; definindo-se menopausa a partir dos 12 meses de amenorreia, seguida pela redução de atividade hormonal ovariana, na ausência de indução cirúrgica ou hormonal, nuliparidade, uso de terapia de reposição hormonal, aleitamento materno (≥3 meses), tabagismo (definiu-se como uso de charuto, cachimbo ou cigarro de uma ou mais vezes durante 30 dias anteriores à coleta de dados, ou o fato de ter sido fumante por mais de 1 ano no decorrer da vida), ingestão de álcool (>15 gramas de etanol/dia, ingestão de suplementos vitamínicos, subtipo tumoral, linfonodos comprometidos e estadiamento tumoral clínico.

3.10 AVALIAÇAO ANTROPOMÉTRICA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

Para avaliação antropométrica foram coletados dados de peso (kg), altura (metros), circunferência da cintura (centímetros) e composição corporal através da bioimpedância. Para a aferição do peso foi utilizado balança digital (Plenna, São Paulo, Brasil), com capacidade de 150kg e precisão de 100g. A altura foi obtida pelo estadiômetro Alturaexata (TBW, São Paulo, Brasil), com limite máximo de 2,10 metros e precisão de 1mm. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi obtido através do cálculo peso kg/m2 e classificado de acordo com as recomendações da (OMS, 2000) para adultos até 59 anos e Organização Pan-americana de Saúde (OPAS, 2002) a partir de 60 anos. A circunferência da cintura foi medida ao nível da

cicatriz umbilical com fita inelástica. Utilizou- se a definição de obesidade abdominal a partir dos pontos de corte propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2000), com baixo risco (CC< 80 cm), moderado (80 ≤ CC<88 cm) e risco aumentado (>88 cm). A composição corporal foi avaliada pela BIA tetrapolar (Biodinâmico®, Modelo 450, TBW, São Paulo, Brasil) utilizando corrente elétrica de 800 µA e frequência de 50 KHz. A partir da Bioimpedância elétrica (BIA) obteve-se o ângulo de fase, percentual de massa gorda (%MG) e percentual de massa magra (%MM).

3.11 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

3.11.1 Coleta de sangue

Amostras de sangue (20 mL) foram coletadas após jejum de 12 horas por profissional capacitado em local reservado e equipado a fim de oferece segurança biológica ao coletor e ao doador de sangue. As amostras foram coletadas em tubos vacuntainer com ácido etilenodiamunotetraacético-EDTA (1 mg/mL) com uso de anticoagulante e antioxidantes, protegidos da luz até a obtenção do plasma (1500 g, 10min, 4ºC). Acrescentaram- se ao plasma os seguintes inibidores de proteases: hidroxitoluenobutilado-BHT (20 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF (1 mM), benzamidina (2 mM) e aprotinina (2 ug/mL). Tanto o plasma quanto os eritrócitos foram aliquotadas e permaneceram armazenados a -80ºC até o momento das análises. As amostras foram transportadas de Fortaleza para São Paulo seguindo as normas da *International Air Transport Association* (IATA), categoria B (material biológico não infeccioso).

3.11.2 Biomarcadores de inflamação

Utilizou-se cerca de 200 µL de soro para realizar o ensaio de citocinas por meio do kit comercial Human Magnetic Painel Bead Milliplex® MAP (HCY T0 MAG-, Merck Millipore). Selecionou-se previamente marcadores específicos para analisar citocinas inflamatórias (IL-6, IL1β, TNF-α e MCP-1) e anti-inflamatória (IL-10). Todos os padrões de trabalho foram submetidos a diluições em série, após a reconstituição da solução padrão do kit. No ensaio das amostras de plasma, os padrões foram diluídos em uma matriz específica fornecida pelo fabricante. O imunoensaio consistiu em adição à placa de 25 µl de beads de MagPlex® adicionadas a 25 µl do sobrenadante das amostras ou 25 µl dos padrões apropriados

em cada poço seguido por 2 horas de incubação em um agitador de placas à temperatura ambiente. Após lavagem da placa, o anticorpo de detecção foi adicionado ao ensaio e incubado durante 1 hora em um agitador de placas. A Estreptavidina-ficoeritina foi utilizada para detectar a intensidade repórter fluorescente que cada microesfera emite quando vinculada a amostra. O equipamento Luminex 200™ com sistema de tecnologia xMAP® e software de aquisição xPONENT® foram utilizados para capturar a detecção de fluorescência presente em cada amostra na placa de 96 poços. O software MILLIPLEX® Analyst 5.1 foi utilizado para integrar a aquisição dos dados obtidos com a análise dos mesmos.

Os valores (em pg/mL) das citocinas MCP-1 e TNF-α foram obtidos a partir de curva padrão fornecida pelo software, enquanto as citocinas IL-6, IL1-β e IL-10 foram obtidas a partir de estimativa com curva linear pelo mesmo software. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Para realização dessas análises trabalhou-se em parceria com o Laboratório de Processos Inflamatório no Câncer (ICB-USP), sob a responsabilidade da Profa. Marilia Seelaender.

3.11.3 Adipocinas

A leptina foi dosada no plasma por meio do kit ELISA (Enzo Life Sciences®) (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) baseado em um imunoensaio competitivo e colorimétrico. Os resultados foram expressos em ng/mL, seguindo protocolo da fabricante.

A adiponectina no plasma foi quantificada por meio do kit ELISA (Adipogen®) por método de imunoensaio competitivo e colorimétrico. Os resultados foram expressos em µg/mL, segundo protocolo do fabricante.

2.11.4 Vitaminas Antioxidantes (retinol, α-tocoferol, β-caroteno)

Mensurou-se a concentração dos antioxidantes lipossolúveis utilizando o sistema de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE). Pipetou-se 200 µL do plasma das pacientes e adicionou-se 200 µL de etanol, seguida de homogeneização em vortex por 5 segundos. Em seguida, adicionou-se 500 µL de hexano retornando ao vortex para homogeneização por mais 2 minutos cronometrados. Posteriormente, essa solução foi centrifugada a 4° C em 3000 rpm, por 5 minutos. Então, retirou-se o sobrenadante, sendo transferido para tubos de ensaio e levados para secagem no Tubovap, por 15 minutos.

As amostras secas foram resuspensas em 200 µL de fase móvel (acetonitrila- 70%

etanol, metanol- 20%, 10% de diclorometano, em uma solução final de 100 mL), sendo essa solução homogeneizada rapidamente no vortex e filtrada em unidade filtrante HV em PE com membrana durapore (0,45 µm de poro 13mm, não estéril). Após filtragem realizou-se injeção de 50 µL da solução no aparelho HPLC.

Realizou-se a leitura dos picos de cada antioxidante, sendo apresentados na seguinte ordem: retinol, α-tocoferol e β-caroteno. A partir dessa leitura calculou-se os resultados usando a razão entre a área do pico de amostra e as do padrão sendo os resultados apresentados em µmol/L.

3.11.4 Marcadores de estresse oxidativo

3.11.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A partir de 50 µL de plasma adicionou-se 1 mL de solução de ácidos tiobarbitúrico (0,046 M), ácido tricloroacético (0,92 M) e ácido clorídrico (0,25 M), que foram incubados em banho-maria a 100 ºC por 30 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 4º C por 15 minutos a 8000 g, com leitura do sobrenadante (200 µL) feita a 535 nm. Foi realizada quantificação através de curva padrão construída com 1,1,3,3 tetratoxiprapano (TEP) (0,2 a 4 mol de TBARs/L) (ANTOLOVICH et al. 2002). Os valores foram expressos em mol de TBARs/mg de proteína total e realizadas em duplicatas.

3.11.4.2 Detecção de LDL (-) no Plasma

Para a detecção da LDL (-) utilizou-se *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e seguiu-se o protocolo padronizado por nosso grupo de pesquisa. As placas (Costar ®, modelo 3690, Corning, USA) foram sensibilizadas com Anticorpo Monoclonal Anti-LDL (-) (MAb-1A3) (0,5 µg/mL, 50 µL/poço), diluído em tampão Carbonato-Bicarbonato, (0,25 M, pH 9,6), sendo então incubadas overnight (16h) a 4° C. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes, por imersão em tampão fosfato salina (PBS) - Tween 0,05%. Então, os sítios livres foram bloqueados com leite desnatado (Molico ®, Nestlé, São Paulo, Brasil), diluído a 2 % em PBS-Tween 0,01% e incubados a 37° C por 2 horas.

Depois da incubação, as placas foram lavadas, por imersão, 3 vezes, com PBS Tween 0,05%, sendo então adicionados 50 µL/poço do plasma das pacientes diluído 1:1000 em leite desnatado (Molico ®, Nestlé, São Paulo, Brasil), preparado a 1% em PBS Tween 0,01%,

seguindo com incubação a 37° C por 1h 30. A placa foi então lavada, por imersão, 3 vezes, com PBS Tween 0,05%.

Em seguida, foram adicionados 50 µL/poço de anticorpo monoclonal anti-LDL (-) biotinilado (Ac-2C7b) (10 µg/mL), diluído em leite desnatado (Molico ®, Nestlé, São Paulo, Brasil), preparado a 1% em PBS Tween 0,01%. As placas seguiram para incubação por 1 h, a 37 ºC, sendo então lavadas por imersão, 3 vezes, com PBS Tween 0,05%.

Após essa etapa, foi adicionada estreptoavidina-peroxidase (1:40000), diluída em leite desnatado (Molico ®, Nestlé, São Paulo, Brasil), preparado a 1% em PBS Tween 0,01% (50 µL/poço), sendo as placas incubadas por 1 h, a 37 ºC e, em seguida lavadas, 4 vezes, por imersão, com PBS Tween 0,05%.

Seguiu-se com a adição de 50 µL/poço da solução de ortofenilenediamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e H2O2 (30%) (250/12/10, µL/mL/µL).

Após incubação de 5 minutos a reação de cor foi bloqueada com 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H2SO4) (2 M) e a absorbância monitorada em 450 nm.

Os resultados foram expressos a partir da média das absorbâncias das amostras menos o background e, posteriormente, aplicados à curva padrão e multiplicados pela respectiva diluição, sendo os resultados expressos em U/L.

3.11.4.3 Detecção de Auto-anticorpos anti-LDL (-) no Plasma

Avaliou-se a concentração de auto-anticorpos anti-LDL(-) por ELISA de captura de anticorpo, em que a LDL (-), isolada por FPLC, foi diluída em tampão Carbonato-Bicarbonato (0,25 M, pH 9,6) até concentração final de 1 µg/ml, pipetada na placa (Costar ®, modelo 3690, Corning, USA) e incubada overnight a 4 ºC, para sensibilização.

Os espaços livres foram bloqueados com leite desnatado, diluído à 5 % em tampão Fosfato-Salina 0,01mol/L (PBS - pH 7,4) e incubados à 37 ºC por 2 h. Após a incubação, lavou-se a placa 4 vezes, por imersão, com PBS-Tween (0,05%).

Em seguida, se diluiu as amostras (1:500) em PBS, as quais foram pipetadas (50 µl/ poço) na placa sensibilizada com LDL (-), seguido de incubação por 2 h à 37 ºC. Em seguida, a placa foi lavada, conforme descrito acima e adicionados 50 µl/poço de anti-IgG humana marcada com peroxidase (1:5000) diluída em PBS. A placa seguiu para incubação, por 1

hora e 30 min, à 37 ºC, e posterior lavagem, conforme descrito acima.

Para avaliar a reatividade adicionou-se o substrato composto por 3,3',5,5'-tetrametilbenzina (TMB), tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 4,2) e H2O2 (30%) (250/12/10, µL/mL/µL), sendo a placa incubada por 15 minutos, à 37 ºC, sob proteção da luz. A reação de cor foi bloqueada com H2SO4 (2,0 M) (50 µl/poço) sendo a absorbância monitorada em 450 nm.

Os resultados foram determinados aplicando-se a média das absorbâncias das duplicatas das amostras - background à equação da curva-padrão de MAb (MAb-1A3) (0.004–0.125 mU/L).

3.11.4.4 Dano oxidativo ao DNA

Para analisar o 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) no plasma, usou-se kit de ELISA competitivo DNA Damage EIA (Enzo Life Sciences, Inc.) a partir do protocolo recomendado pelo fabricante. O 8-OHdG é um derivado oxidado da deoxiguanosina. Trata-se do principal marcador de oxidação do DNA, portanto altas concentrações de 8-OHdG são indicativos de estresse oxidativo.

3.11.4.5 Análise do perfil de ácidos graxos no plasma e nas membranas eritrocitárias

Para a análise de ácidos graxos incorporados às membranas eritrocitárias foram realizadas as etapas presentes na **Figura 6**.

O plasma e os eritrócitos foram centrifugados a 3000 rpm, 15min, 4º C (1). A partir do macerado de hemácias foi realizada a lise dos eritrócitos a partir de 500 µL de amostra (2), sendo essas lavadas com PBS gelado (1:10; v/v, 15min, 3000 rpm) e descartou-se o sobrenadante até que o pellet ficasse livre de hemoglobina, ao final este foi sonicado por 5 minutos (3).

A partir do plasma (100 µL) e do papa de hemácias (500 µL) realizou-se a extração dos ácidos graxos, por método modificado (4), com a adição de 1 mL de Metanol/Clorofórmio HPLC (2:1), seguido de centrifugação por 20 minutos, a 20000 rpm. Repetiu-se por 3 vezes essa etapa, sendo os sobrenadantes obtidos em cada lavagem reunidos e secos em fluxo contínuo de N2 comum (5).

Na esterificação (6) foi adicionado 0,5 mL de Hexano HPLC e 125 μL de metóxido de sódio (0,5M), seguida de sonicação por 20 minutos. Após foi adicionado 2,5 mL de solução de NaCl (cloreto de sódio) saturada, sendo a amostra mantida em repouso por 10 minutos. Em seguida foi acrescentado 1 mL de Hexano HPLC com consequente agitação em vortex por 30 segundos. O sobrenadante (fase hexânica) foi transferida para tubos de vidro. Todos os sobrenadantes reunidos foram secos em fluxo de N_2, sendo toda essa etapa repetida por 4 vezes.

Após a evaporação completa, os ácidos graxos esterificados foram ressuspensos em 0,25 mL de Hexano HPLC, sonicado durante 5 minutos, filtrados (Milipore; 0,22 m) e injetado no Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (7).

Para determinação dos ácidos graxos foi utilizado cromatógrafo a gás Shimadzu (8), CG-2010, equipado com coluna capilar DB-FFAP (15 m x 0,100 mm x 0,10 m- JeW Scientific Agilent Technologies). Como gás de arraste foi utilizado gás hidrogênio com fluxo de 0,27 mL/min, com vazão de 35cm/s e pressão de 187,8 kPa. Utilizou-se fluxo de ar sintético 300 mL/min, N_2 30mL/min e H_2 30 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250ºC e 260ºC, respectivamente. Para retenção de temperatura programou-se a coluna para 100º C inicialmente, com retenção de 0,5 min, rampa de 25º C/min a 195º C, 3º C/min a 205º C, 8º C/min a 230º C, com retenção de 4 minutos, 50ºC/min a 245ºC, retendo por 0,5 min. A razão Split utilizada no injetor oi de 1:150 e o tempo de corrida total foi de 15,56 min.

Como padrão externo (9) utilizou-se mistura formada por 37 ésteres metil de ácidos graxos (FAME 37, código 47885, Sigma ChemicalCo). O volume de injeção foi de 2 μL e injetor automático AOC 20i. Foram identificados os ácidos graxos a partir da comparação dos tempos de retenção entre padrão externo e as amostras (**Anexo 9**). Utilizou-se também padrão interno methyltricosanoate (C23:0, T9900, Sigma ChemicalCo). Todos os resultados foram expressos como média do percentual total de ácidos graxos presentes nas amostras analisadas.

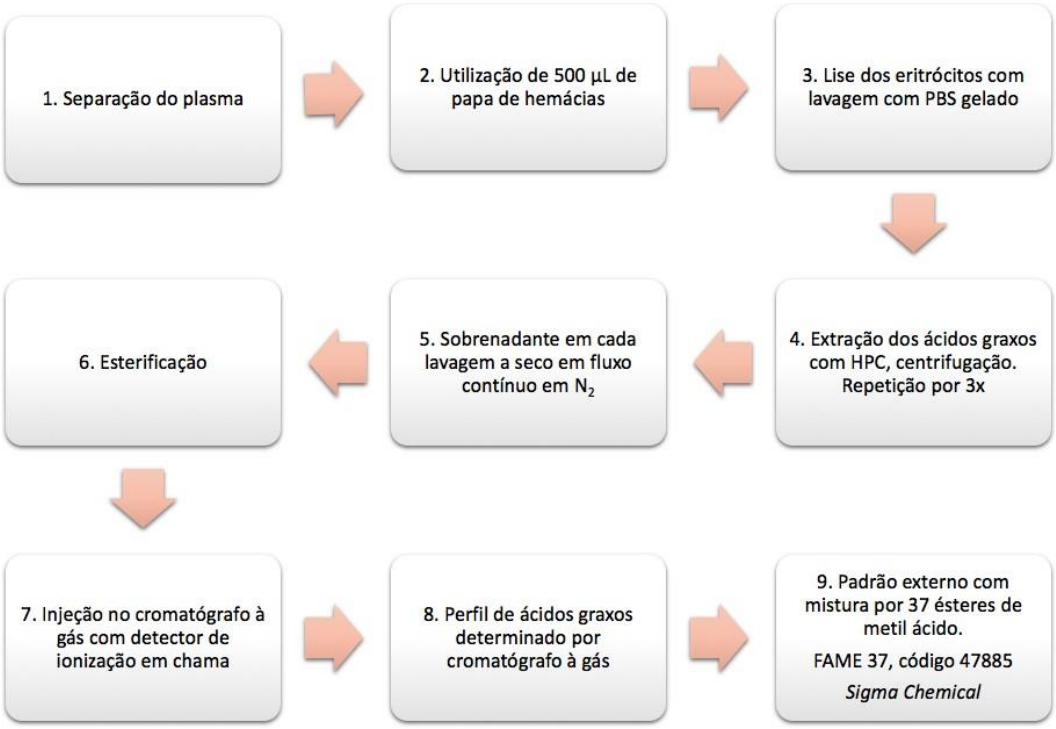


Figura 6. Fluxograma de determinação do perfil de ácidos graxos na membrana dos eritrócitos. Padronização no Laboratório de Nutrição Humana (FSP-USP, Brasil).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados em figuras e tabelas. Foi utilizado teste qui-quadrado para identificar associação entre variáveis qualitativas com resultados expressos em valor absoluto, seguido da respectiva porcentagem. As determinações dos testes basearam-se na distribuição das variáveis, que foram testadas pelo método de Kolmogorov-Smirnov, $p>0,05$. Média, desvio padrão, assim como correlação de Pearson e testes t-Student foram utilizadas nas variáveis com distribuição normal; enquanto testes como Mann-Whitney e correlação de Spearman para as variáveis não paramétricas.

Para regressão linear as variáveis não paramétricas foram transformadas em log10, enquanto as que permaneceram com a mesma distribuição foram excluídas do teste, por não atender os pressupostos de modelagem. Em seguida foi testada correlação de Pearson entre as variáveis dependentes e independentes, sendo admitidas no teste somente aquelas com $p<0,2$. Para posterior ajuste do modelo na regressão linear foram testadas variáveis: Modelo 1: bruto, Modelo 2: menopausa, Modelo 3: tabagismo e Modelo 4: estadiamento clínico, considerando o impacto significativo desses fatores sobre a associação uma alteração do

R2>10%, independentemente do p<0,05. Para as análises de regressão logística foram adotadas as variáveis de tamanho tumoral, estresse oxidativo e citocinas como variáveis dependentes e os ácidos graxos n-6 e n-3, assim como suas somas e razões como variáveis independentes. Considerando-se que não há valores de referência para ácidos n-6, n-3, citocinas e marcadores de estresse oxidativo, essas variáveis foram divididas em quartil, tercil ou mediana e realizou- se o teste qui-quadrado entre variável dependente e independente. Somente aquelas que apresentaram p< 0,2 no teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram aceitas para serem testadas nos modelos de regressão logística. Posteriormente, foram testados modelos ajustados: Modelo 1: bruto, Modelo 2: menopausa, Modelo 3: tabagismo, Modelo 4: estadiamento clínico. O programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), 24.0 (SPSS Incorporation, 2014) foi utilizado para as análises estatísticas. Para figuras foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0. Foi considerado significativo o valor de p< 0,05.

4. ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS

O estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do HGF (nº 050507/10) e da FSP/USP (nº 2162) (**Anexos 3 e 4**). A Coleta de dados só se iniciou após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**). Todos os procedimentos de obtenção e divulgação de informações seguiram as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Saúde, disposto no item de Ética em Pesquisa com Humanos. O projeto foi financiado pela FAPESP (Proc 2011/12523-2), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluídos Completos (INCT-FCx 2016-2021) e do Núcleo de Apoio à Pesquisa de Fluídos Complexos (NAP-FCx 2011-2016). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001- bolsa número 33002010163P6.

5. RESULTADOS

Ao término da coleta 87 pacientes com diagnóstico de câncer de mama foram incluídas no estudo, enquanto o grupo Controle foi composto por 100 mulheres. A **Figura 7** demonstra o fluxo de admissão das pacientes ao longo do estudo.

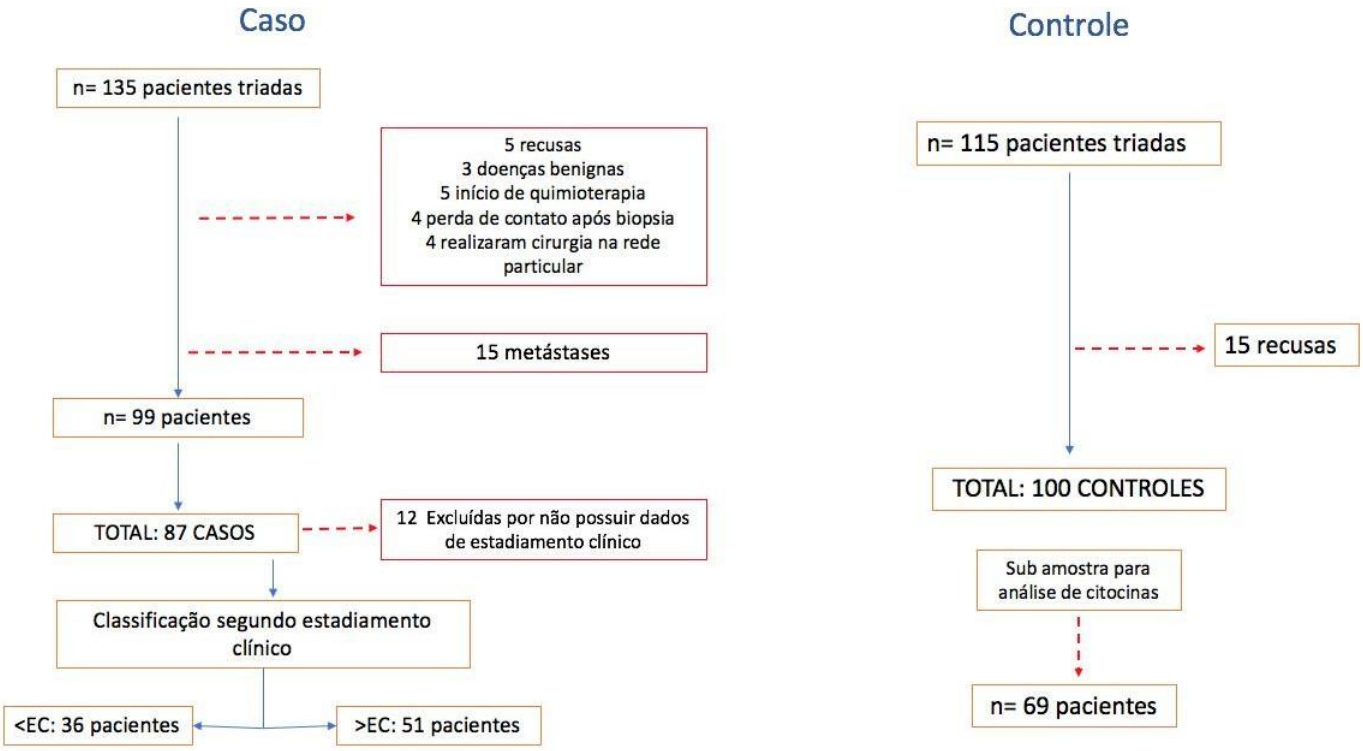


Figura 7. Fluxograma de captação de pacientes.

As pacientes do grupo Caso apresentaram idade média de 50,6 (26-88) anos, enquanto as do grupo Controle tiveram média de 48,2 (21-77) anos (**Tabela 1**). Não houve diferença entre estado civil, etnia, escolaridade, renda, IMC, percentual de massa adiposa e muscular e ângulo de fase. As mulheres do grupo Caso tiveram maior circunferência da cintura (CC) quando comparadas ao grupo Controle (96,2 versus 91,2 cm, p= 0,002). Essas diferenças foram intensificadas quando as pacientes do grupo Caso foram analisadas segundo os critérios de estadiamento clínico, em que 88% das mulheres no grupo <EC e em 75% no grupo >EC apresentaram valores de CC classificados como elevado ou muito elevado. Tanto as mulheres Caso quanto Controles apresentaram sobrepeso, segundo classificação pelo IMC (IMC> 24,9 m/kg^2) (OMS, 2000).

Tabela 1. Caracterização demográfica e antropométrica de mulheres, segundo presença de neoplasia maligna de mama. São Paulo, 2019.

	Caso (n=87)	Controle (n=100)	p
Idade, anos	50,6 (11,3)	48,2 (12,9)	0,168
Estado civil, n (%)			
Casada	49 (56,3)	41 (41)	0,155
Solteira	21 (23,1)	36 (36)	
Viúva	9 (10,3)	13 (13)	
Outros	8 (9,1)	10 (10)	
Etnia, n (%)			
Branco	19 (21,8)	16 (16)	0,057
Pardo	48 (55,2)	74 (74)	
Outros	20 (23)	10 (10)	
Escolaridade, n (%)			
Fundamental incompleto/completo	41 (47,1)	49 (49)	0,975
Médio incompleto/completo	28 (32,2)	34 (34)	
Superior incompleto/completo	18 (20,7)	17 (17)	
Renda, n (%)			
≤ 1SM	52 (59,8)	57 (57)	0,598
2-6 SM	35 (40,2)	43 (43)	
IMC (kg/m^2)	28,1 (4,7)	27,1 (4,4)	0,156
Circunferência da cintura (cm)	96,2 (10,7)	91,2 (10,1)	**0,002**
Massa adiposa (%)	35,7 (4,7)	34,5 (4,7)	0,408
Massa magra (%)	64,3 (4,7)	65,5 (4,8)	0,094
Ângulo de fase (Φ)	6,4 (0,92)	6,3 (0,68)	0,571

Variáveis apresentadas em valores absolutos seguidas por porcentagem para categóricas e média e desvio padrão para as contínuas. Diferenças entre grupos avaliadas por meio do teste $\chi 2$ e teste t- student para variáveis contínuas. Valor de significância $p<0,05$. SM: salário mínimo, valores de 2010 R$510,00. IMC: Índice de massa corporal.

A **Tabela 2** mostra que não houve diferença na idade da menarca, estado de menopausa, uso de terapia hormonal, nuliparidade, amamentação, tabagismo, etilismo e histórico familiar de CM, no entanto houve diferença estatística em relação ao histórico familiar de CM, com as mulheres do grupo Caso apresentando maior frequência de histórico em mães e irmãs. O grupo com neoplasia apresentou maior tempo de tabagismo.

Tabela 2. Caracterização clínica de mulheres, segundo neoplasia maligna de mama. São Paulo, 2019.

	Caso (n=87)	Controle (n=100)	p
Idade da Menarca, anos	13,6 (1,9)	13,6 (1,8)	0,895
Menopausa, sim, n (%)	43(49,4)	58 (58)	0,303
Idade da menopausa, anos	47,7 (5,3)	45,6 (6,4)	0,093
Terapia de Reposição hormonal, sim, n (%)	8(9,2)	6 (6,0)	0,421
Nuliparidade, sim, n (%)	15(17,2)	21 (21)	0,579
Amamentação, sim, n (%)	60 (69)	63 (63)	0,660
Tabagismo, sim, n (%)	37(42,5)	35 (35)	0,297
Tempo de tabagismo, anos	20,4 (14,8)	13,5 (11,2)	**0,031**
Etilismo, não, n (%)	16(18,4)	20 (20)	0,910
Histórico familiar de CM, sim, n (%)	63(72,4)	66 (66)	0,428
Parente com CM, n (%)			
Mãe	19(21,8)	11 (11)	
Irmã	13(14,9)	5 (5)	
Avó	6(6,9)	8 (8)	**0,047**
Tia	11(12,6)	20 (20)	
Outros	14(16,1)	22 (22)	

Variáveis apresentadas em valor absoluto seguidas por porcentagem, ou média e desvio padrão. Diferenças entre grupos foram avaliadas por meio de teste $\chi 2$ para variáveis categóricas e t-student para variáveis contínuas. Valor de significância $p<0,05$. Tabagismo: considerou-se tabagista aquela que fuma ou já fumou.

Os grupos <EC (1,6 cm) e >EC (3,2 cm) apresentaram tamanhos tumorais diferentes ($p<0,001$), conforme pressupostos previamente definidos (**Tabela 3**) e foram diferentes segundo a idade (54,4 versus 48,5 anos, $p= 0,023$). O tumor do tipo ductal foi o mais frequente (79,3 %), sendo 41 % no grupo >EC e 28 % no grupo <EC. Apenas o grupo >EC apresentou mulheres com tumores triplo negativo (5,9 %), enquanto os outros marcadores apresentaram distribuição semelhante entre os dois grupos.

Tabela 3. Caracterização tumoral e Índice de Karnofsky em mulheres com câncer de mama segundo estadiamento clínico. São Paulo, 2019.

	<EC (n=36)	>EC (n=51)	Total (n=87)	p
Idade, anos	54,4 (11,7)	48,5 (10,5)	50,6 (11,3)	**0,023**
Estadiamento clínico, n (%)				
0	4 (11,1)		4 (4,6)	
I	1 (2,8)		1 (1,1)	
Ia	28 (77,8)		28 (32,2)	
II	3 (8,3)		3 (3,4)	
IIa		19 (37,3)	19 (21,8)	
IIb		11 (21,6)	11 (12,6)	
III		2 (3,9)	2 (2,3)	
IIIa		3 (5,9)	3 (3,4)	
IIIb		12 (23,5)	12 (13,8)	
IIIc		4 (7,8)	4 (4,6)	
Tamanho tumoral, n (%)				
Tis	2 (5,6)		2 (2,3)	
T1	29 (80,6)	5 (9,8)	34 (39,1)	
T2	5 (13,9)	21 (41,2)	21 (24,1)	
T3		10 (19,6)	10 (11,5)	
T4		13 (25,5)	13 (14,9)	
Tamanho tumoral, cm	1,6 (0,6)	3,2 (2,16)	2,6 (1,9)	**<0,001**
Subtipo tumoral, n (%)				
Lobular	6 (16,7)	3 (5,9)	9 (10,3)	0,156
Ductal	28 (77,8)	41 (80,4)	69 (79,3)	
Receptores, n (%)				
RP+	15 (41,7)	22 (43,1)	37 (42,5)	0,952
RE+	18 (50)	22 (43,1)	40 (46,0)	0,151
HER+	8 (22,2)	9 (17,6)	17 (19,5)	0,652
Triplo negativo	0	3 (5,9)	3 (3,4)	**0,003**
Ki67 +	16 (44,4)	29 (56,9)	45 (51,7)	0,52
Índice de Karnofsky, n (%)				
100	35 (97,2)	50 (98,0)	85 (97,7)	0,242
90	1 (2,8)	0	1 (1,1)	
70	0	1 (2,0)	1 (1,1)	

Variáveis apresentadas em valores absolutos seguidas de porcentagem ou média e desvio padrão. Diferenças entre grupos (<EC versus >EC) foram avaliadas por meio de teste $\chi 2$ para variáveis categóricas e t-Student para variáveis contínuas paramétricas ou Mann-Whitney para as não paramétricas. Valor de significância $p<0,05$. Tamanho tumoral classificado a partir de exame anatomopatológico e sistema TNM, segundo AJCC sétima edição. Índice de Karnofsky: 100-normal, 90- capaz de realizar atividades normais, 70-capaz de cuidar de si mesmo, mas incapaz de trabalhar. RP+: receptor de progesterona positivo, RE+: receptor de estrógeno positivo, HER+: receptor tipo 2 de fator de crescimento epitelial positivo, Ki67+: positivo para proteína nuclear Ki67.

Os resultados de adipocinas, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo **(Tabela 4**) mostram que os grupos foram homogêneos em relação à leptina, alfa-tocoferol, retinol, betacaroteno, LDL (-), e 8-OHdG. A adiponectina se apresentou elevada em relação ao grupo Caso (11,5 versus 8,9 g/mL, p= 0,001), enquanto os marcadores de estresse oxidativo tais como anticorpo anti-LDL (-) (4,6 versus 2,8 U/L, p<0,001) e TBARS (6,0 versus 4,7 mol p<0,01) estavam em concentrações maiores nas mulheres com CM.

Tabela 4. Caracterização dos parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo e citocinas, segundo neoplasia maligna de mama. São Paulo, 2019.

	Caso (n=87)	Controle (n=100)	p
Perfil bioquímico			
Leptina (ng/mL)	29,9(17,9)	29,9 (17,5)	0,980
Adiponectina (µg/mL)	8,9(5,5)	11,5 (3,5)	**0,001**
Estresse oxidativo			
Alfa tocoferol (µmol/L)	11,2(2,72)	11,5 (3,5)	0,996
Retinol (µmol/L)	1,7(0,5)	1,7 (0,5)	0,949
Beta caroteno (µmol/L)	0,5(0,4)	0,5 (0,4)	0,618
LDL (-) (U/L)	3,9(3,0)	2,5 (2,0)	0,061
Anticorpo anti-LDL (-) (U/L)	4,6(3,2)	2,8 (2,3)	**<0,001**
TBARS (µmol)	6,0(1,5)	4,7 (1,1)	**<0,001**
8-OHdG (ng/mL)	17,9 (5,5)	20,2 (20,0)	0,145
Citocinas			
MCP-1 (pg/mL)	357,8 (28,4)	295,8 (11,4)	**0,026**
TNF-α (pg/mL)	30,9 (5,9)	29,3 (2,2)	0,346
IL-1β (pg/mL)	2,8(2,2)	1,3 (0,1)	**<0,001**
IL-6 (pg/mL)	0,9(0,2)	1,6 (0,1)	**<0,001**
IL-10 (pg/mL)	2,8(1,1)	5,5 (1,2)	**<0,001**

Variáveis apresentadas em média e desvio padrão. Diferenças entre grupos foram avaliadas por meio do teste t-Student para variáveis paramétricas e Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. Valor de significância p<0,05. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. 8-OHdG: 8-hidroxi-2'deoxiguanosina. LDL (-): Lipoproteina de baixa densidade eletronegativa. MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa. IL: Interleucina.

Considerando o padrão inflamatório dos Casos e Controles (**Figura 8**), todos os biomarcadores, com exceção do TNF-α foram diferentes entre os dois grupos. Tanto a MCP-1 (357,8 versus 295,8 pg/mL, p:0,026) quanto IL-1β (2,81 versus 1,3 pg/mL, p<0,001) foram maiores no grupo Caso, enquanto o grupo Controle apresentou concentrações superiores para as demais citocinas.

Quando se analisou o padrão de citocinas segundo estadiamento clínico não se observou diferença significativa. A MCP-1 e o TNF-α não apresentaram concentrações diferentes entre mulheres com alto ou baixo estadiamento comparadas às mulheres do grupo Controle. Os valores de IL-6 plasmáticos foram superiores nas mulheres do grupo Controle quando comparadas às mulheres <EC e >EC. De forma semelhante, as concentrações plasmáticas de IL-10 foram maiores nas mulheres do grupo Controle do que as concentrações das mulheres segundo estadiamento clínico. Contudo, a citocina IL-1β apresentou concentrações mais altas nos Controles em comparação com o grupo de baixo estadiamento, enquanto o grupo de maior estadiamento apresentou concentrações maiores dessa citocina.

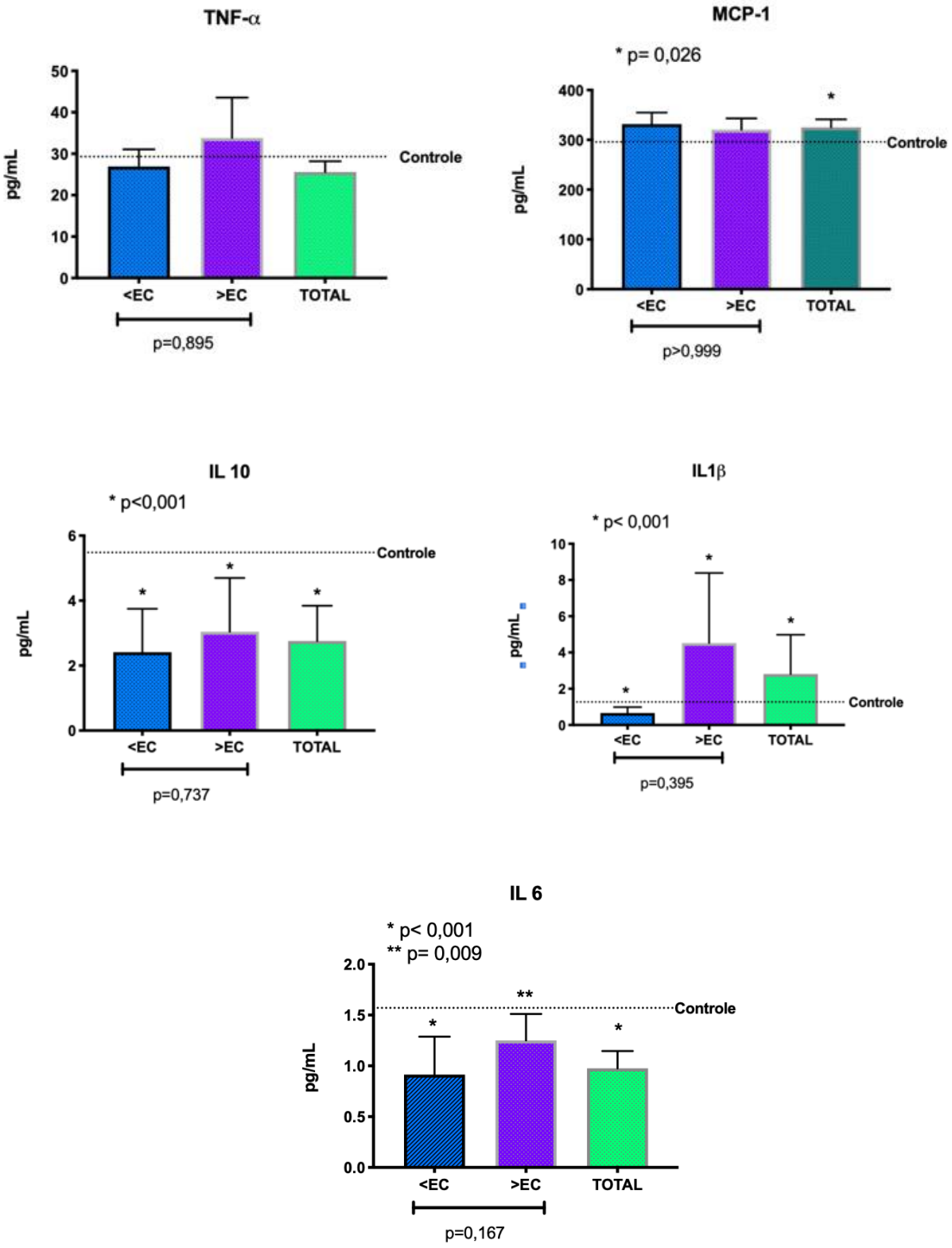


Figura 8. Concentração plasmática de citocinas. TNF-α- Fator de necrose tumoral alfa. MCP-1- Proteína quimioatrativa de monócito 1. IL- interleucina. Valores apresentados em média e erro padrão. *,** diferença estatística em comparação ao grupo controle.

Não houve diferença nos grupos de estadiamento clínico nas concentrações dos principais biomarcadores de estresse oxidativo (**Figura 9**), entretanto eles apresentaram maiores concentrações de autoanticorpo LDL (-) quando comparados ao grupo Controle. Somente mulheres com baixo estadiamento apresentaram concentrações maiores de LDL (-), comparadas ao grupo Controle, enquanto as concentrações desse marcador foram homogêneas entre os Grupos Caso e Controle.

Para o marcador de oxidação lipídica TBARS, os grupos <EC e >EC apresentaram concentrações mais elevadas do que o grupo Controle. O marcador de dano ao DNA 8-OHdG apresentou valores plasmáticos semelhantes entre os grupos segundo estadiamento clínico e grupo Controle. Em relação a adiponectina e leptina não houve diferenças segundo estadiamento clínico. A adiponectina no grupo <EC apresentou concentração semelhante ao grupo Controle, enquanto mulheres com estadiamento maior possuíam concentrações mais elevadas. Segundo os grupos de estadiamento, as concentrações de leptina mostraram-se homogêneas em todos os grupos analisados.

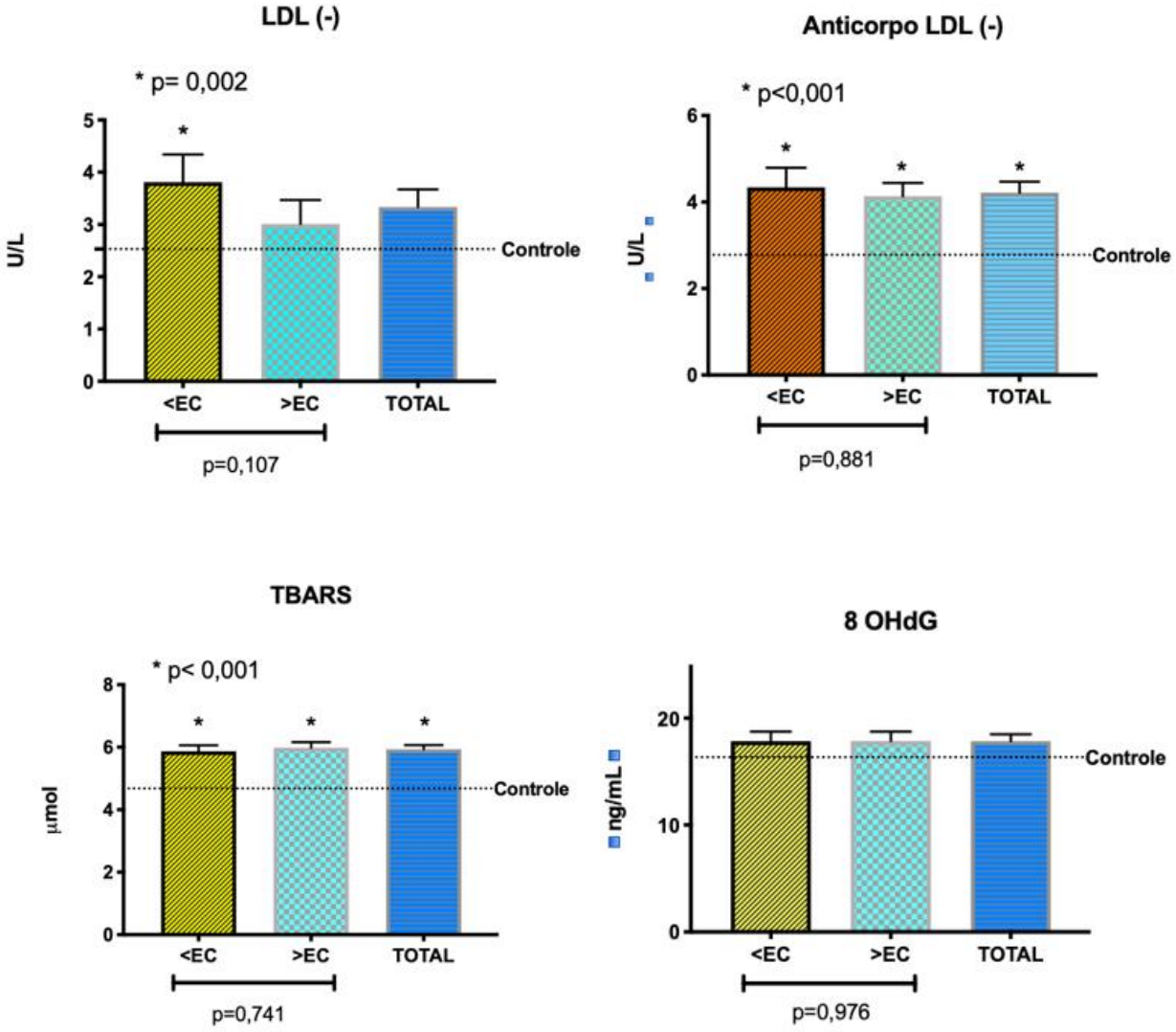


Figura 9. Concentração plasmática de marcadores de estresse oxidativo entre mulheres com neoplasia mamária com alto e baixo estadiamento clínico. Valores apresentados em média e desvio padrão. Diferença entre grupos feita por teste Mann-Whitney. Valor da significância p<0,05. <EC: baixo estadiamento clínico. >EC: alto estadiamento clínico. Controle: mulheres livres de neoplasia mamária. 8-OHdG: 8-hidroxi-2'deoxiguanosina. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. *,** - Diferença estatística em relação ao grupo Controle.

Para se compreender melhor o impacto das diferentes classificações do CM nas concentrações de citocinas realizou-se a análise pela estratificação segundo a presença de receptores de estrógeno (RE +/-). Somente a citocina IL-6 apresentou diferença estatística entre os dois grupos (0,1 versus 1,0 pg/mL, p=0,038), indicando um perfil mais inflamatório nas pacientes com RE-. Em relação ao RP e HER2 não houve diferença entre citocinas e a presença ou não desses receptores. Em relação aos marcadores de estresse oxidativo mulheres RE+ apresentaram média de leptina menor do que as RE- (6,3 versus 27,5 ng/mL, p=0,033) e adiponectina (5,8 versus 10,4 g/mL, p=0,023). Não houve diferença nos parâmetros de estresse oxidativo segundo mulheres HER2 +/-.

Para se entender melhor o balanço pró-inflamatório (MCP-1, IL-1β, TNF-α e IL-6) e anti-inflamatório (IL-10), utilizou-se a razão entre essas citocinas (**Figura 10**).

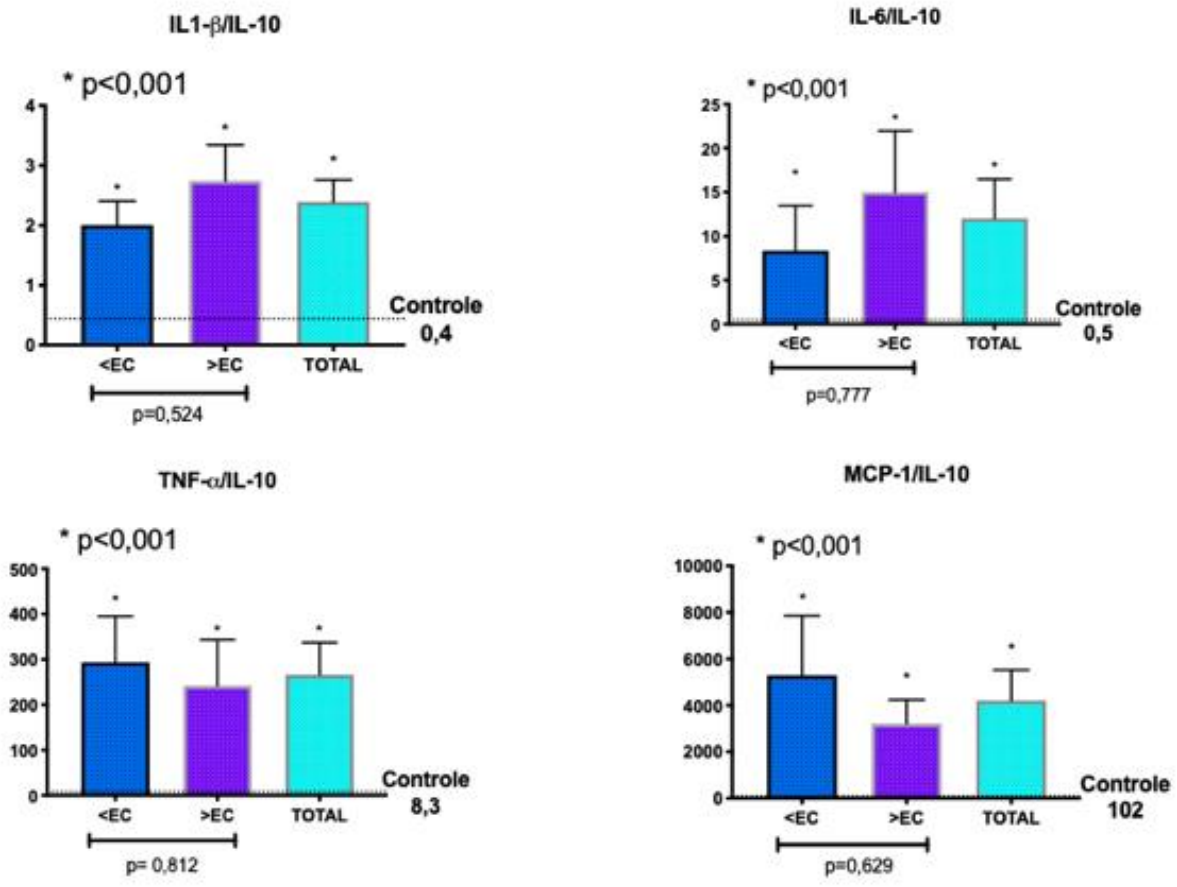


Figura 10. Razão entre concentração plasmática de citocinas pró e anti-inflamatórias entre mulheres com neoplasia mamária segundo alto e baixo estadiamento clínico e grupo controle. Valores apresentados em média e desvio padrão. Diferença entre grupos foram feitas pelo teste Mann-Whitney. Valor da significância p<0,05. <EC: baixo estadiamento clínico. >EC: alto estadiamento clínico. Controle: mulheres livres de neoplasia mamária. MCP-1: proteína 1 quimioatrativa de monócito. TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa.IL-10: Interleucina 10, IL-1β: Interleucina 1-beta, IL-6: interleucina 6. * Diferença estatística em relação ao grupo Controle.

Todas as razões mostram um padrão com maior concentração de citocinas inflamatórias no grupo Caso, comparado ao grupo Controle. Apesar das concentrações dos grupos segundo estadiamento serem maiores que o grupo Caso, elas foram estatisticamente semelhantes entre si.

A **Tabela 5** apresenta a distribuição de ácidos graxos presentes no plasma. A razão n-6/n-3 foi maior no grupo de >EC em comparação com o grupo <EC (8,03 versus 7,28 p= 0,016), assim como a razão LN/EPA (46,2 versus 38,2, p= 0,048). As razões LN/DHA (10,2 versus 8,9; p= 0,054) e LN/EPA+DPA+DHA (6,3 versus 5,5; p= 0,057) foram semelhantes entre os dois grupos, embora tenham apresentaram tendência a estar aumentada no grupo de maior estadiamento.

Tabela 5. Perfil dos ácidos graxos plasmáticos segundo estadiamento clínico em mulheres com câncer de mama. São Paulo, 2019.

	<EC (n=50)		**>EC** (n=86)		**TOTAL**		**P**
Ácidos Graxos	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
SAFAS, %	39,3	3,04	39	3,6	39,12	3,4	0,732
MUFAS, %	21,8	3,66	21,2	3,3	21,44	3,5	0,385
PUFAS, %	38,9	4,88	39,8	5,4	39,44	5,2	0,422
Ácido mirístico, %	0,6	0,37	0,7	0,5	0,68	0,5	0,473
Ácido palmítico, %	27,6	3,32	27,1	3,9	27,32	3,7	0,554
Ácido palmitoleico, %	2,5	0,8	2,5	0,8	2,51	0,8	0,739
Ácido esteárico, %	11	1,68	11,2	1,6	11,13	1,6	0,666
Ácido oleico, %	19,3	3,23	18,7	2,9	18,93	3	0,366
Soma n-3, %	4,9	1,15	4,5	1,1	4,67	1,1	0,163
Soma n-6, %	34	4,45	35,3	4,7	34,77	4,6	0,212
LN, %	21,6	3,84	22,9	3,5	22,33	3,7	0,123
ALA, %	0,6	0,21	0,6	0,2	0,63	0,2	0,827
ARA, %	9,3	2,59	9,2	2,8	9,2	2,6	0,852
EPA, %	0,7	0,25	0,6	0,2	0,61	0,2	0,126
DPA, %	0,9	0,2	0,9	0,3	0,89	0,2	0,733
DHA, %	2,7	0,91	2,4	0,8	2,55	0,8	0,142
LN+ARA, %	30,9	4,35	32	4,4	31,54	4,4	0,245
EPA+DPA+DHA, %	4,2	1,17	3,9	1,1	4,04	1,1	0,163
n-6/n-3	7,3	1,52	8	1,3	7,72	1,4	**0,016**
LN/ARA	2,5	0,88	2,7	0,9	2,63	0,9	0,827
LN/EPA	38,2	18,06	46,3	18,4	42,9	18,6	**0,048**
LN/DHA	8,9	3,31	10,2	3,1	9,65	3,3	0,054
LN/EPA+DHA+DPA	5,5	1,92	6,3	1,7	5,94	1,8	0,057
Δ-5 desaturase *	2,3	0,58	2,4	0,4	2,32	0,5	0,343
Δ-6- desaturase **	36,6	9,91	39,3	12,9	38,18	11,8	0,512

Resultados apresentados em porcentual da área de todos os ácidos graxos analisados. Diferenças entre grupos (<EC versus >EC) feita por teste t-Student para variáveis paramétricas e Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. Valor de significância p<0,05. SAFAS: soma de ácidos graxos saturados, MUFAS: soma de ácidos graxos monoinsaturados, PUFAS: soma de ácidos graxos poli-insaturados, EPA: ácido eicosapentaenoico, DPA: ácido docosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico, LN: ácido linoleico, ALA: ácido alfa-linolênico, ARA: ácido araquidônico, N-6: ácidos graxos da série ômega 6, N-3: ácidos graxos da série ômega 3. Soma de ácidos graxos n-3 calculado como somatória de ALA+EPA+DHA+DPA. Soma de ácidos graxos n-6 calculado como somatória de LN+ARA+adrênico+dihomo-gama-linolênico. *Δ-5 desaturase: ARA/EPA, **Δ-6 desaturase: LN/ARA

Ao analisar o percentual de ácidos graxos nas membranas dos eritrócitos (**Tabela 6**) observou-se que o grupo de >EC apresentou menor conteúdo de DHA do que o grupo <EC (3,4% versus 4,0%, p= 0,020), perfil que impactou na razão LN/DHA (3,7 versus 3,0 p= 0,015).

Por meio de correlações verificou-se a existência de associação entre as concentrações de ácidos graxos nos compartimentos plasmáticos e eritrocitários. A soma LN+ARA do plasma se correlacionou moderadamente com o conteúdo eritrocitário (r= 0,482, p<0,001), assim como a razão LN/EPA do plasma com o eritrocitário (r= 0,454 p<0,001) e LN/ARA (r= 0,628, p<0,001).

O ALA mostrou correlação negativa com o marcador de estresse oxidativo 8-OHdG (r= -0,323, p= 0,006), enquanto o EPA eritrocitário apresentou correlação negativa com tamanho tumoral (r= -0,285, p= 0,033) e correlação positiva com as razões LN/ARA (r= 0,267, p= 0,047) e LN/EPA (r=0,266, p= 0,048) eritrocitárias.

Apesar dos grupos <EC e >EC apresentarem valores semelhantes de citocinas e de marcadores de estresse oxidativo, houve correlação inversa entre concentração de ALA plasmático e 8-OHdG (r= -0,323, p= 0,006), que demonstra possível papel protetor das concentrações de ALA na proteção ao dano ao DNA, enquanto a correlação de alta concentração de EPA eritrocitário se correlacionou com menor tamanho tumoral (r= -0,285, p= 0,033) e reforça que maiores concentrações de metabólitos de n-3 são encontrados em pacientes com menores estadiamentos, enquanto maior concentração de produtos derivados dos ácidos n-6 estão em maior concentração em pacientes do grupo >EC, em que razões LN/ARA e LN/EPA se correlacionaram com maior tamanho tumoral (r= 0,267 e r= 0,266, respectivamente).

Tabela 6. Perfil ácidos graxos presentes à membrana eritrocitária, segundo estadiamento clínico tumoral em mulheres com câncer de mama. São Paulo, 2019.

	<EC (n=33)		**>EC** (n=49)		**TOTAL** (n=82)		p
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
SAFAS, %	39,3	3,35	39,8	3,18	39,6	3,24	0,716
MUFAS, %	16,0	2,16	16,8	2,32	16,5	2,27	0,137
PUFAS, %	44,7	3,88	43,4	3,74	43,9	3,82	0,243
Ácido palmítico, %	16,8	4,96	17,0	4,53	17,0	4,67	0,928
Ácido esteárico, %	22,4	2,05	22,7	2,07	22,6	2,05	0,508
Ácido oleico, %	16,0	2,16	16,8	2,32	16,5	2,27	0,137
Soma n-6, * %	37,7	3,13	37,0	3,07	44,6	6,82	0,362
LN, %	10,6	1,65	10,9	1,42	10,8	1,51	0,429
ARA, %	21,2	3,19	20,4	2,76	20,8	2,95	0,228
EPA, %	0,6	0,32	0,8	0,98	0,7	0,78	0,580
DPA, %	2,4	0,56	2,2	0,53	2,3	0,55	0,166
DHA, %	4,0	1,33	3,4	1,30	3,6	1,34	**0,020**
n-6/n-3	5,7	1,54	6,2	1,54	6,0	1,54	0,191
EPA+DPA+DHA, %	7,0	1,77	6,4	1,78	6,7	1,79	0,127
LN+ARA, %	31,3	2,52	31,9	2,58	31,5	2,54	0,355
LN/ARA	0,5	0,14	0,6	0,14	0,5	0,14	0,255
LN/EPA	20,5	9,47	21,5	10,32	21,1	9,93	0,542
LN/DHA	3,0	1,32	3,7	1,47	3,4	1,44	**0,015**
LN/EPA+DHA+DPA	1,6	0,58	1,8	0,59	1,6	0,59	0,123
Δ-5 desaturase**	5,1	1,75	5,4	1,81	5,3	1,79	0,333

Resultados apresentados em porcentual da área de todos os ácidos graxos analisados. Diferenças entre grupos (<EC versus >EC) feita por teste t-Student para variáveis paramétricas e Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. Valor de significância p<0,05. SAFAS: soma de ácidos graxos saturados, MUFAS: soma de ácidos graxos monoinsaturados, PUFAS: soma de ácidos graxos poli-insaturados, EPA: ácido eicosapentaenoico, DPA: ácido docosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico, LN: ácido linoleico, ARA: ácido araquidônico, N-6: ácidos graxos da série ômega 6, N-3: ácidos graxos da série ômega 3. * Soma de ácidos graxos n-6 calculado como somatória de LN+ARA+adrênico+dihomo-gama-linolênico, ** -5 desaturase: ARA/EPA.

Os modelos de regressão linear univariado e múltiplos mostraram que a soma de n-6 eritrocitário foi capaz de explicar o aumento dos níveis plasmáticos de Anticorpo anti-LDL(-) em 2% mesmo após ajuste pelos fatores de confusão (β=0,02, p=0,027), enquanto o conteúdo eritrocitário de ácido araquidônico explicou 2% no aumento desse anticorpo, mas após ajustes perdeu a significância (β=0,019, p=0,066). O aumento de LDL (-) sofreu influência de 3% pela soma de n-6 plasmático (β=0,03, p=0,002), enquanto o ácido linoleico plasmático influenciou 5% (β=0,049, p=0,001) e a soma linoleico com araquidônico foi responsável por um aumento de 3,4% (β=0,034, p=0,002). O DPA plasmático foi responsável pela diminuição de IL-6 em 2 vezes (β=-2,0, p=0,041) e o ALA plasmático em diminuir a concentração de 8-OHdG em 27% (β=-0,27, p=0,016), porém após ajustes pelos fatores de confusão essa associação não foi mais significativa (p=0,107). Analisando as associações entre tumor e parâmetros antropométricos encontrou-se que a chance de ter tumor maior conforme diminui o ângulo de fase foi de 59% (β=-0,59, p=0,030) mesmo sob influência das variáveis idade, tabagismo e estado de menopausa.

Por meio de modelos de regressão logística observou-se que o ácido graxo n-3 plasmático EPA não se associou com o tamanho tumoral (**Tabela 7**) mesmo após os ajustes (p=0,132). A razão LN/DHA na membrana dos eritrócitos, apesar de ter apresentado tendência significativa (p=0,058) quando associado ao maior tamanho tumoral, esta não se manteve após ajuste pelo estadiamento clínico. A soma de ácidos n-6 eritrocitários mostrou associação com a chance de maior tumor, permanecendo essa associação após ajuste pelo estadiamento clínico.

A citocina anti-inflamatória IL-10 se associou inversamente com o tamanho tumoral, favorecendo as chances para diminui-lo. Por sua vez o ácido n-3 DHA eritrocitário (**Tabela 8**) se associou com maior chance de alta concentração plasmática da IL-10.

Tabela 7. Modelos de regressão logística múltipla segundo tamanho tumoral. São Paulo, 2019.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Variável	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)	OR (IC 95%)
EPA*			
< 0,65	ref	ref	ref
≥ 0,65	0,32 (0,10-1,08)	0,37 (0,10-1,3)	0,32 (0,10-1,6)
LN/DHA **			
< 3,66	ref	ref	ref
≥ 3,66	2,79 (0,97-9,19)	1,77 (0,50-6,27)	2,69 (0,96-9,19)
Soma n-6 **			
< 39,02	ref	ref	ref
≥ 39,02	**4,08 (1,02-16,22)**	3,83 (0,94-15,68)	**4,89 (1,11-21,52)**
LN/EPA*			
< 41,29	ref	Ref	ref
≥ 41,29	**4,29 (1,38-13,25)**	**3,23 (1,11-11,80)**	**4,34 (1,39-13,50)**
LN/EPA+DHA+DPA **			
< 1,68	ref	ref	ref
≥ 1,68	**3,36 (1,08-10,44)**	1,98 (0,55-7,16)	**3,54 (1,10-10,84)**
IL-10			
<4,18	ref	ref	ref
≥ 4,18	0,24 (0,06-1,06)	**0,22 (0,031)**	0,23 (0,05-1,00)
Anticorpo Anti-LDL (-)			
<4,55	ref	ref	ref
≥ 4,55	**3,36 (1,29-12,1)**	**3,67 (1,12-11,54)**	**4,08 (1,31-12,64)**

Regressão logística (modelo 1 - bruto; modelo 2 - ajustado pela menopausa; modelo 3 ajustado pelo tabagismo; modelo 4- ajustado pelo estadiamento clínico). OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%; EPA: ácido eicosapentaenoico; Soma n-6: calculado como soma de ácido linoleico +

araquidônico + adrênico e dihomo-gama-linolênico; DHA: ácido docosahexaenoico; LN: ácido linoleico; * plasma, ** eritrocitário.

A concentração plasmática elevada de ácido araquidônico evidenciada pela alta razão ARA/EPA+DHA (**Tabela 8**) se associou com níveis elevados de MCP-1, mesmo após ajustes. O conteúdo eritrocitário de EPA se associou inversamente com baixa concentração sérica de IL-6 e de IL-1β. Entretanto, a associação de altas concentrações de EPA eritrocitário com baixa concentração de TNF-α não foi estatisticamente significativa. Maior concentração de EPA plasmático também se associou inversamente com baixa concentração de IL-1β e de TBARS, ao passo que alta concentração de ácidos graxos n-6 tais como na razão LN/ARA eritrocitário foram associados com alta concentração de TBARS sérico mesmo após ajuste por idade, tabagismo e menopausa (**Tabela 9**).

Tabela 8. Modelos de regressão logística múltipla segundo citocinas plasmáticas. São Paulo, 2019.

	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
Variável (%)	OR (p)	OR (p)	OR (p)	OR (p)
		IL-10		
DHA **				
<4,31	ref	ref	ref	ref
≥ 4,31	**4,43 (1,12-16,7)**	**4,67 (1,23-26,0)**	**5,20 (1,26-21,40)**	**4,30 (1,11-16,66)**
Soma n-3 **				
< 4,08	ref	ref	ref	ref
≥ 4,08	4,24 (0,79-22,84)	4,57 (0,80-26,01)	5,21 (0,90-30,0)	4,49 (0,81-24,78)
		IL-1β		
EPA*				
< 0,65	ref	ref	ref	ref
≥ 0,65	**0,11 (0,01-0,93)**	**0,11 (0,01-0,96)**	**0,11 (0,01-0,96)**	0,12 (0,01-1,03)
EPA **				
<0,60	ref	ref	ref	ref
≥ 0,60	**0,13 (0,02-0,66)**	0,18 (0,01-1,73)	0,19 (0,21-1,69)	0,19 (0,02-1,77)
EPA+DHA+DPA **				
< 3,85	ref	ref	ref	ref
≥ 3,85	0,27 (0,06-1,13)	0,27 (0,06-1,15)	**0,22 (0,04-0,98)**	0,25 (0,05-1,09)
		MCP-1		
ARA/EPA+DHA *				
< 5,99	ref	ref	ref	ref
≥ 5,99	**6,00 (1,38-26,0)**	**6,15 (1,40-26,97)**	**6,29 (1,35-29,26)**	**6,29 (1,42-27,81)**

Continuação

Variável	Modelo 1 OR (IC 95%)	Modelo 2 OR (IC 95%)	Modelo 3 OR (IC 95%)	Modelo 4 OR (IC 95%)
		IL-6		
DPA *				
< 0,86	ref	ref	ref	ref
≥ 0,86	**0,23 (0,07-0,75)**	**0,20 (0,05-0,69)**	**0,23 (0,07-0,765)**	**0,21 (0,06-0,72)**
EPA **				
< 0,68	ref	ref	ref	ref
≥ 0,68	0,24 (0,05-1,03)	0,13 (0,02-0,80)	0,24 (0,05-1,09)	0,25 (0,05-1,11)
Soma n-3 *				
< 5,06	ref	ref	ref	ref
≥ 5,06	**0,25 (0,07-0,85)**	**0,23 (0,06-0,83)**	**0,23 (0,06-0,85)**	**0,22 (0,06-0,82)**
ALA *.		**TNF-α**		
< 0,76	ref.	ref	ref	ref
≥ 0,76	0,23 (0,04-1,26)	0,24 (0,04-1,40)	0,24 (0,04-1,30)	0,23 (0,04-1,30)
EPA **				
< 0,53	ref	ref	ref	ref
≥ 0,53	0,23 (0,05-1,03)	**0,19 (0,03-1,03)**	0,23 (0,05-1,03)	0,25 (0,05-1,16)

Regressão logística (modelo 1 - bruto; modelo 2 – ajustado pela idade; modelo 3 ajustado pelo tabagismo; modelo 4- ajustado pela idade, menopausa e tabagismo). OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%; Soma n-3: calculado como soma de ácido alfa-linolênico + EPA+ DPA + DHA; EPA: ácido eicosapentaenoico; DPA: ácido docosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido alfa-linolênico; ARA: ácido araquidônico; LN: ácido linoleico; * plasma. **; eritrocitário.

A soma de ácidos graxos n-6 também se associou com maior chance de apresentar concentrações de LDL (-) superiores à 37,5 U/L (**Tabela 9**). O anticorpo anti-LDL (-) mostrou associação com maior tamanho tumoral e essa associação se manteve após por estadiamento clínico (**Tabela 7**) e a alta concentração de n-6, evidenciada pela razão n-6/n-3, foi positivamente associada ao conteúdo sérico de autoanticorpos anti-LDL (-) mesmo sob

influência do estadiamento clínico. O aumento das concentrações de ácidos araquidônico e da soma de ácidos graxos n-6 presentes no plasma promovem aumento das chances de maiores concentrações de auto anticorpos anti-LDL (-). Mesmo após o ajuste pelos fatores de confusão para CM, a soma de n-3 presente no plasma se associou com menor concentração de 8-OHdG, enquanto altas concentrações de n-6 plasmáticos, evidenciadas por uma razão alta n-6/n-3, se associaram com elevadas concentrações de 8-OHdG (p= 0,014).

Tabela 9. Modelos de regressão logística múltiplas segundo marcadores de estresse oxidativo. São Paulo, 2019.

Variável		Modelo 1 OR (IC 95%)	Modelo 2 OR (IC 95%)	Modelo 3 OR (IC 95%)	Modelo 4 OR (IC 95%)
			TBARS		
LN/ARA **					
<0,57		ref	ref	ref	ref
≥ 0,57		**8,67 (2,77-27,11)**	**11,17 (3,0-40,77)**	**8,82 (2,78-27-98)**	**9,44 (2,91-30,62)**
EPA *					
	< 0,56	ref	ref	ref	ref
	≥ 0,56	**0,29 (0,10-0,85)**	**0,32 (0,10-0,96)**	**0,28 (0,09-0,81)**	**0,27 (0,09-0,81)**
			LDL (-)		
LN/ARA *					
	< 2,58	ref	ref	ref	ref
	≥ 2,58	2,68 (0,94-7,51)	2,79 (0,95-8,13)	2,66 (0,94-8,13)	2,68 (0,95-7,58)
LN*					
	<23,79	ref	ref	**ref**	ref
		2,64	**3,02**	**2,84**	**2,79**
	≥ 23,79	**2, 54 (1,03-6,73)**	**3,02 (1,01-9,04)**	**2,84 (1,1-7,4)**	**2,79 (1,1-7,22)**
Soma n-6 **					
<37,52		ref	ref	ref	ref
		2,64	**2,63**	**2,77**	**2,79**
≥ 37,52		**2,64 (1,03-6,73)**	2,63 (0,98-7,02)	**2,77 (1,1-7,3)**	**2,79 (1,08-7,22)**
			8-OHdG		
ALA *					
	< 0,59	ref	ref	ref	ref
	≥ 0,59	**0,17 (0,06-0,46)**	**0,18 (0,06-0,51)**	**0,15 (0,05-0,45)**	**0,16 (0,06-0,45)**
Soma n-3*					
	<5,32	ref	ref	ref	ref

≥ 5,32	**0,28 (0,10-0,72)**	**0,27 (0,10-0,71)**	**0,34 (0,12-0,95)**	**0,27 (0,10-72)**
DHA *				
<3,0	ref	ref	ref	ref
≥ 3,0	**0,36 (0,13-0,95)**	**0,35 (0,12-0,95)**	0 42 (0,10-1,19)	**0,34 (0,12-0,94)**
n-6/n-3 *				
<7,7	ref	ref	ref	ref
≥ 7,7	**2,82 (1,10-7,20)**	**4,23 (1,44-12,41)**	**2,86 (1,04-7,85)**	**2,97 (1,12-7,88)**
		Anticorpo Anti-LDL (-)		
n6/n3 *				
< 7,77	ref	ref	ref	ref
≥ 7,77	**2,58 (1,08-6,15)**	2,25 (0,92-5,50)	**2,53 (1,06-6,07)**	**2,45 (1,02-5,91)**
Soma n-6 *				
< 37,35	ref	ref	ref	ref
≥ 37,35	**2,6 (1,06-6,38)**	**2,67 (1,03-6,93)**	**2,59 (1,06-6,53)**	**2,67 (1,06-6,45)**
ARA **				
< 21,87	ref	ref	ref	ref
≥ 21,87	**3,07 (1,14-8,19)**	**3,38 (1,22-9,34)**	**2,87 (1,06-7,79)**	**3,25 (1,19-8,84)**

Regressão logística (modelo 1 - bruto; modelo 2 - ajustado pela idade; modelo 3 ajustado pelo tabagismo; modelo 4- ajustado pela idade, menopausa e tabagismo). OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de Confiança de 95%; soma n-3: calculado como soma de EPA + DPA + DHA; Soma n-6: calculado como soma de ácido linoleico + araquidônico + adrênico e dihomo-gama-linolênico; Soma n-3: calculado como soma de ácido alfa- linolênico + EPA+ DPA + DHA; EPA: ácido eicosapentaenoico; DPA: ácido docosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido alfa-linolênico; ARA: ácido araquidônico; LN: ácido linoleico; * plasma; ** eritrocitário.

6. DISCUSSÃO

Quando comparadas com as mulheres saudáveis, o presente estudo mostrou que mulheres com CM apresentaram maior estresse oxidativo, avaliado pelo TBARS e anticorpos anti-LDL (-) e maior inflamação, monitorada por meio da maior razão MCP-1 IL-1β e IL-6 e menor IL-10. Esse perfil se associou com menores concentrações de adiponectina e maior circunferência da cintura.

De fato, as mulheres com CM apresentaram em média 5,5% maior circunferência da cintura que as mulheres livres de neoplasia. Esses resultados estão de acordo com outros estudos da área. Em mais de 11 mil coreanas verificou-se que altos valores de circunferência da cintura se associaram com maior risco de CM (LEE et al., 2018). Da mesma forma uma coorte com mais de 28 mil mulheres brancas na menopausa encontrou a mesma associação entre circunferência da cintura e risco CM (GAUDET et al., 2014).

O tabagismo, conhecido fator de risco para o desenvolvimento do CM, mostrou-se com frequências elevadas na amostra estudada. De forma semelhante, em uma coorte no Reino Unido, Jones et al. (2017) encontraram aumento modesto do risco de CM em mulheres que fumavam, principalmente naquelas que faziam uso do cigarro desde a época pré-menarca.

A produção de anticorpos contra LDL (-) indica resposta do sistema imune contra produtos oxidados e serve de parâmetro para estimar o grau de exposição do indivíduo à oxidação. Confirmando nossos pressupostos, mulheres com CM apresentaram valores maiores de autoanticorpos anti-LDL (-) do que mulheres sem neoplasia, assim como maiores valores de TBARS. Previamente, Panis et al. (2012), estudando 60 mulheres com CM, encontraram maiores concentrações de TBARS em mulheres com maior estadiamento concomitantemente com redução da atividade de catalase e altas concentrações de peroxidação de lipídios e óxido nítrico. Esse padrão nos permite especular que em situações de neoplasia mamária há intensa produção de produtos oxidativos que ultrapassam a capacidade de defesa antioxidante endógenas e exógenas. Possivelmente, um dos fatores que contribuíam com esse fenômeno seja a mudança do padrão alimentar, resultando no consumo baixo de alimentos ricos em vitaminas E, A, assim como outros biocompostos antioxidantes, podendo ser um dos responsáveis por esse desequilíbrio no status oxidativo (VIEIRA et al., 2011).

As concentrações de marcador de dano ao DNA 8-OHdG apresentaram valores semelhantes entre Caso e Controle. Possivelmente, o fato de ambos os grupos apresentarem sobrepeso e percentual de massa gorda elevados possa explicar as concentrações elevadas de danos ao DNA. Sabe-se que a alta adiposidade contribui para o desenvolvimento de um ambiente mais inflamatório e mais oxidativo que poderá levar a dano celular crônico (BABAEI et al., 2015; CRESPI; BOTTAI; SANTARPIA, 2016; HIMBERT et al., 2017).

Acrescenta-se a esse perfil o reduzido conteúdo de adiponectina proposto como um possível biomarcador no CM. Alguns estudos têm mostrado que há concentrações baixas dessa adipocina em mulheres com neoplasia mamária (GU et al., 2018). De forma semelhante, nas mulheres Caso as concentrações de adiponectina foram menores que as mulheres Controle. Minatoya et al. (2015) encontraram proteção contra CM em mulheres com maior concentração de adiponectina, mas somente no grupo pós-menopausa, sem qualquer efeito sob o grupo pré-menopausa. Mulheres com CM na menopausa costumam apresentar maior adiposidade e desbalanço entre as adipocinas, o que justifica, em parte, o fato da adiponectina aumentar o risco de CM somente nesse período. De modo geral o aumento do risco em mulheres na pré-menopausa está mais relacionado a fatores hereditários ou outros fatores relacionados com a vida reprodutiva (SIGHOKO et al., 2013).

Outros fatores de risco que diferenciaram os grupos CM e Controle foi a alta frequência de tabagismo atual ou pregresso. Já é bem descrito na literatura o impacto causado pelo cigarro no organismo, sobretudo como agentes capazes de induzir dano ao nível do núcleo celular, sendo fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de neoplasias (ELLEGAARD; POULSEN, 2016; JONES et al., 2017; MANSOORI; JAIN, 2015).

Analisando o perfil inflamatório dos Casos e Controles encontrou-se maiores concentrações de MCP-1 e IL-1β nos Casos. A MCP-1 já havia sido estudada como citocina inflamatória capaz de induzir tumorigênese no CM (DUTTA et al., 2018), enquanto Lubowicka et al. (2018) encontraram maior concentração de MCP-1 em mulheres com CM, apresentando concentrações ainda mais elevadas conforme o aumento do estadiamento. Apesar das mulheres com CM apresentarem maiores concentrações de MCP-1 que o Controle, não houve influência dessa citocina no estadiamento tumoral. A

MCP-1, no CM, está relacionada com tumores mais evasivos e metastáticos (DUTTA et al., 2018) ou com a forma triplo negativo. Como houve somente três pacientes nessa categoria não foi possível fazer uma análise estatística para investigar essa associação, entretanto, observou-se que, em média esses três apresentaram maior concentração que o controle (334,4 versus 295 ng/mL) e em relação ao estadiamento <EC apresentou menor concentração (334,4 versus 332 ng/mL).

Na resposta inflamatória a produção de IL-1β pelas células imunes ocorre como uma das primeiras etapas de liberação de citocinas que elevarão o padrão inflamatório. No âmbito do CM esta citocina está associada com piora do prognóstico e metástase (JEON et al., 2016). As mulheres com CM apresentaram maior concentração dessa citocina do que as Controle, da mesma forma mulheres com estadiamento maior (>EC) as concentrações de IL-1β foram maiores. OH et al. (2016) descreveram que a alta produção dessa citocina no CM ocorre por ativação das vias de sinalização celular NF-kB, Pi3K e por mecanismos dependentes de JNK. Em modelos celulares esses sinais demonstraram maior capacidade de evasão celular.

Assim como as outras citocinas inflamatórias, o TNF-α e a IL-6 têm sido descritos como citocinas que apresentam altas concentrações em pacientes com CM (MA et al., 2017). Essa citocina pró-inflamatória é responsável por favorecer o desenvolvimento tumoral e tem sido associada com a piora do prognóstico (MARTÍNEZ-REZA; DÍAZ; GARCÍA-BECERRA, 2017). Diferentemente do encontrado na literatura (MASJEDI *et al.*, 2018), as paciente Controle apresentaram concentrações superiores de IL-6 do que as pacientes com CM, mesmo quando estratificadas pelo estadiamento (<EC e >EC). Contudo, se analisarmos o perfil inflamatório dessas pacientes, por meio da razão IL-6/IL-10 observamos que mulheres com CM e o grupo >EC apresentaram razões superiores que as do grupo Controle, demonstrando que mulheres com CM podem apresentar maiores concentrações de biomarcadores inflamatórios, os quais se agravam conforme o aumento do estadiamento. De forma semelhante a razão TNF-α pela IL-10 mostrou um status inflamatório exacerbado das mulheres Caso em comparação às mulheres Controle, com concentrações maiores conforme aumento do estadiamento. Esse desbalanço entre estímulo pró e anti-inflamatório influencia no aumento do risco de CM, assim como promove maior desenvolvimento da doença, uma vez ela já instalada (JIANG; SHAPIRO, 2014). Comparar a relação que as concentrações de citocinas

inflamatórias possuem com a anti-inflamatória mostra-se mais adequado para compreender o status inflamatório do que observar suas concentrações isoladas uma vez que em todas as razões entre citocinas analisadas, as pacientes Caso mostraram valores superiores aos Controles.

De forma bem estabelecida, o impacto deletério da inflamação no câncer participa de todos os seus processos de iniciação, desenvolvimento, promoção e invasão. Altas concentrações de citocinas inflamatórias estão associadas com ativação de fatores de transcrição NF-kB, mas também envolvem outros fatores como STAT3 e p53 (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2011). Todas essas vias de sinalização convergem para maiores estímulos proliferativos e alteração da homeostase celular. Esse metabolismo alterado também contribui para maior produção de espécies reativas de oxigênio, exacerbando o estresse oxidativo celular (HOESEL; SCHMID, 2013).

Há muitas controvérsias a respeito da efetiva ação da IL-10 no câncer de mama. Uma revisão por Hamidullah et al. (2012) mostram que mulheres com CM apresentam elevadas concentrações de IL-10 e que, a depender do compartimento estudado – tecido tumoral ou soro –, o efeito é antagônico. Estudos apontados nessa revisão mostram que altas concentrações de IL-10 no microambiente se associavam com desenvolvimento tumoral e aqueles realizados no soro com melhor prognóstico. De modo peculiar, a interação da massa tumoral com o seu tecido adjacente e os componentes do sistema imune parecem funcionar de forma antagônica a luz da dinâmica sistêmica (CORRÊA *et al.*, 2017). No microambiente acredita-se que há estimulação dos macrófagos para produzir citocinas anti-inflamatórias e inibir as pró-inflamatórias, favorecendo um ambiente protegido da efetiva atuação do sistema imune nas células locais, as quais podem, assim, se desenvolver sem receber injúrias do sistema de defesa. Essa teoria encontra apoio nas hipóteses de Hanahan e Weinberg (2011), em que a evasão do tumor ao sistema imune é uma das características que define o conceito de neoplasia.

Zhao *et al.* (2015) em meta-análise encontraram que altas concentrações de IL-10 no soro estavam associadas a maiores estadiamentos e piores prognósticos. De forma semelhante Zhuangwei *et al.* (2018) encontraram associação entre maiores valores de IL-10 em pacientes com formas mais agressivas de CM e em estadiamentos maiores. Em contraponto a esses estudos, Ahmad *et al.* (2018) e Li *et al.* (2014) encontraram que elevadas concentrações de IL- 10 em pacientes com CM se associaram com baixo

estadiamento e bom prognóstico. Uma das hipóteses que explica a IL-10 elevada na CM avançada consiste na tentativa do organismo em conter o crescente status inflamatório gerado pela doença, ao passo que altas concentrações de IL-10 nos primeiros estágios da CM se associam a uma maior defesa efetiva do organismo frente ao crescente desenvolvimento tumoral (HAMIDULLAH; CHANGKIJA; KONWAR, 2012).

No caso deste estudo a concentração de IL-10 foi maior em mulheres Controle do que em mulheres com CM e foi superior em ambos os grupos segundo estadiamento (<EC e >EC), além de se associar com menor tamanho tumoral. Esses resultados permitem especular que a IL-10 sistêmica tenha um papel benéfico nas pacientes estudadas e esteja presente em menor concentração em mulheres com CM, independentemente do estadiamento.

O recordatório de 24 horas (R24h) tem sido uma ferramenta muito utilizada na área da nutrição para avaliar o consumo alimentar e estimar a ingestão de macro e micronutrientes (CASTELL; SERRA-MAJEM; RIBAS-BARBA, 2015). Contudo, assim como outros métodos de avaliação alimentar, o R24h apresenta limitações, tais como o fato de depender da memória do entrevistado, a possibilidade de se sub ou superestimar as porções de alimentos ingeridas e necessitar da disponibilidade de tabelas nutricionais com os valores dos nutrientes para os alimentos analisados (GIBSON; CHARRONDIERE; BELL, 2018). Diante disso, a busca por marcadores que mostre o real status nutricional frente ao nutriente de interesse se mostra como uma melhor alternativa para associar a ingestão do nutriente com o evento biológico. No caso dos ácidos graxos n-6 e n-3, seu consumo e sua suplementação são capazes de alterar a concentração plasmática, refletindo uma ingestão alimentar recente, enquanto a incorporação às membranas eritrocitárias reflete ingestão pregressa desses ácidos graxos, inclusive em pacientes com CM (MOLFINO *et al.*, 2017).

Após suplementação com óleo de peixe (1296 mg EPA+ 864 mg DHA/dia) ou óleo de linhaça (3510 mg ALA+ 900 mg LN/dia) por 8 semanas CAO *et al.*, (2006) encontraram que a concentração nas membranas eritrocitárias aumentou 300% no conteúdo de EPA e 42% de DHA no uso de óleo de peixe e 133% de EPA e 120% de DPA com o óleo de linhaça, permanecendo as concentrações de DHA inalteradas. Também se verificou que a concentração desses ácidos graxos no plasma apresentava um *turnover* mais rápido que o observado nas membranas dos eritrócitos (cerca de 120 dias). Por esse motivo, cada vez

mais a determinação dos ácidos graxos ao nível tecidual é utilizada como biomarcador de ingestão de n-6 e n-3. Embora o conteúdo de ácidos graxos plasmáticos reflita momentos distintos da ingestão alimentar, há apenas correlação moderada entre eles, portanto se faz necessária a avaliação desses dois biomarcadores em conjunto, pois ambos refletem compartimentos e períodos distintos, devendo se adequar conforme o objetivo desejado. Portanto, o conteúdo de n-3 e n-6 no plasma e incorporados às membranas mostraram alta correlação com os conteúdos desses ácidos no tecido mamário tornando-se um marcador dietético mais fidedigno do consumo habitual. Straka *et al.*, (2015) analisaram que o conteúdo desses ácidos graxos apresentaram alta concordância, indicando que o conteúdo incorporado às hemácias reflete o conteúdo do tecido mamário.

No presente estudo, a maior razão n-6/n-3 no plasma de pacientes com maior estadiamento e maior concentração de DHA em pacientes do grupo <EC mostram um padrão de maior concentração de ácidos n-6 nos pacientes com tumores maiores e baixa concentração de n-3. Esses resultados estão de acordo com Choi e Yim (2017) que demonstraram que pacientes com CM apresentam alta razão n-6/n-3. Já Rahrovani *et al.*, (2017) observaram que indivíduos sem neoplasias apresentavam até 3% mais conteúdo de ácidos n-3 na membrana dos eritrócitos do que indivíduos com câncer. Nossos resultados mostraram que o grupo >EC apresentou 8,5% maior razão de n-6/n-3 e razão de LN/EPA 21,2% superior que o grupo <EC. Hirko *et al.* (2017) em 794 casos de mulheres com CM encontraram que elevada proporção de ácidos graxos saturados e *trans* nas membranas eritrocitárias estava correlacionada com a presença de CM, ao passo que ácidos graxos n-3 estavam em menor proporção nessas pacientes. Em 80 mulheres recém-diagnosticadas com CM observou-se que o conteúdo de LN e ARA nas membranas eritrocitárias foi superior ao conteúdo de n-3. De forma similar, Simopoulos *et al* (2016) observaram associação positiva entre a razão n-6/n-3 e risco de CM.

O desbalanço entre as concentrações de n-6 e n-3, por meio do maior consumo alimentar de fontes de n-6, pode resultar na alteração o metabolismo, mesmo diante da preferência química das enzimas COX e LOX pelos ácidos n-3, situação em que a ação das enzimas é deslocada de forma a acelerar a cascata de produção de compostos pró-inflamatórios, estes relacionados com vias pró-oncogênicas e pró-proliferativas. Altas proporções de metabólitos derivados do n-6 são relacionadas a diminuição na sinalização de apoptose, ativações de vias proliferativas, de resistência à quimioterápicos e de piora

do prognóstico (BASSETT et al., 2016; MANSARA, P. P. et al., 2015). Associações entre tamanho tumoral menor e maior concentração de derivados de n-3, especialmente EPA e DHA, são descritos em alguns estudos (TSOUKAS et al., 2015; VARA-MESSLER et al., 2017). A literatura sugere que altas concentrações de n-3 possam promover efeitos antioncogênicos, por meio de maior apoptose e menor crescimento neoplásico comparado ao ambiente rico em n-6. Tamanho tumoral menor reflete em estadiamento clínico menor, apresentando relação com melhor prognóstico.

De forma a corroborar com os resultados encontrados no plasma e nas membranas eritrocitárias, as concentrações de EPA, DPA e DHA estão inversamente associadas às citocinas IL-6 e IL-1β, TBARS, autoanticorpos LDL (-) e 8-OHdG e positivamente associadas às concentrações de IL-10, independentemente dos fatores de confusão testados nos modelos de regressão logística. Esses resultados sustentam o argumento que os ácidos graxos da série n-3 podem promover um ambiente menos inflamatório e com menor estresse oxidativo, o que pode resultar na diminuição do desenvolvimento tumoral. Ao encontro com essa hipótese, observou-se que, mesmo sob a influência do estado de menopausa, idade e tabagismo, altas concentrações de EPA e de IL-10 plasmáticos se associam a tumores menores, ao passo que altas concentrações de ácidos n-6 e seus derivados e de anticorpo anti-LDL (-) foram associados com tumores maiores. O estresse oxidativo está ainda mais exacerbado quando há também maior concentração de n-6 em detrimento ao n-3. Maior conteúdo de ácidos n-3 e menor razão n-6/n-3 no plasma se associaram com menor dano ao DNA, e maior concentração de ARA. Alguns estudos já demonstraram que os danos causados pelo estresse oxidativo estão envolvidos na carcinogênese e na piora do prognóstico (BODAI *et al.*, 2017; CRAWFORD, 2014; JAKOVCEVIC *et al.*, 2015) e que alterações na proporção n-6/n-3 são capazes de aumentar ou diminuir a concentração desses compostos. Estudo desenvolvido por Zrate *et al*, (2017) mostrou o papel dos ácidos n-6 e n-3 em várias doenças. No caso de neoplasias sugere-se que altas concentrações de n-6 estavam presentes em pacientes com câncer e pacientes sadios possuíam maior consumo de alimentos fontes de n-3.

Tanto o EPA quanto o DHA incorporados às membranas foram capazes de induzir apoptose em estudo realizado com mulheres com CM (CORSETTO *et al.*, 2011) por maior expressão de Bcl-2 e por reduzir a expressão de receptor de fator de crescimento (EGFR). Nesse mesmo estudo os autores observaram que a alta concentração de n-6 foi

capaz de influenciar a incorporação de n-3 na membrana. Altas concentrações de ARA em detrimento ao EPA e DHA foram associadas também com risco aumentado de desenvolvimento de CM e impacto na sobrevivência dessas pacientes (HIDAKA *et al.*, 2015). A fim de compreender o real impacto das concentrações de n-6 e n-3 incorporados às membranas, e o aumento do risco de CM, HIDAKA *et al.*, (2017) observaram que maiores razões de n-6/n-3 estava presente somente nos tumores mais avançados e que houve associação do aumento do risco de CM, conforme aumento nos ácidos n-6 no eritrócito.

Apesar da controvérsia na literatura sob a real função do IL-10 no desenvolvimento e progressão do CM, quando analisado isoladamente, no presente estudo observou-se associação inversa entre a concentração desta citocina com o tamanho tumoral, e associação positiva com as concentrações de DHA. Corroborando com estes achados, observou-se maiores concentrações de IL-10 entre os controles, sugerindo que ela pode atuar como uma citocina de ação anti-inflamatória. OFT et al, (2014) ao revisar as funções anti-inflamatórias do IL-10, propôs que apesar do aparente papel deletério dessa citocina no câncer, podendo colaborar com o crescimento tumoral em alguns casos, a deficiência na sinalização de IL-10, tanto em ratos quanto em humanos, favorece o desenvolvimento de tumores agressivos e em taxas altas de crescimento. Já a alta expressão dessa citocina foi capaz de induzir rejeição de tumores em camundongos sadios.

Dentre as limitações presentes nesse trabalho encontram-se: a dificuldade de se obter os dados clínicos, de imuno-histoquímica e de classificação dos tumores em um hospital característico do Sistema Único de Saúde (SUS), em especial na região Nordeste do país; ausência de análise do perfil de ácidos graxos plasmáticos e eritrocitários nas pacientes do grupo Controle.

Como ponto forte encontra-se: a utilização dos ácidos graxos plasmático e incorporados nos eritrócitos como marcador da biodisponibilidade do consumo de alimentos fontes de ácidos graxos n-6 e n-3 no grupo Caso. A vantagem desse marcador está no fato de não apresenta os principais vieses característicos de inquéritos alimentares.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que pacientes com CM apresentaram maior perfil inflamatório e maior concentração de parâmetros de estresse oxidativo do que mulheres livres de doença. Além disso aquelas classificadas com maior estadiamento clínico (>EC) apresentaram menores concentrações de ácidos graxos n-3 e seus derivados e maiores concentrações de ácidos graxos da série n-6. O conteúdo plasmático e eritrocitário de ácidos graxos n-3 se associou inversamente com o tamanho do tumor, ao passo que o conteúdo dos ácidos graxos n-6 mostra associação positiva com esses parâmetros. Portanto, baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que o conteúdo plasmático e eritrocitário desses ácidos graxos pode estar associado ao consumo alimentar, é possível que o consumo de alimentos fonte de n-3 e redução dos alimentos fonte de n-6 na dieta possam favorecer as mulheres com diagnóstico de CM na redução da progressão da doença por meio da modulação da inflamação e redução do estresse oxidativo.

8. REFERÊNCIAS

AHMAD, N. et al. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. Cancer Immunology, Immunotherapy, v. 67, n. 4, p. 537–549, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-017-2106-8>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Sociedade Americana do Câncer. Anatomia e compartimentos mamários. disponível em: *https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html* acesso em 18/12/18.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Breast Cancer Staging AJCC. American Joint Committee on Cancer, p. 1–2, 2010. Disponível em: <cancerstaging.org>.

ANDERSON, C. et al. Oxidative stress in relation to diet and physical activity among premenopausal women. British Journal of Nutrition, v. 116, n. 08, p. 1416–1424, 2016. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114516003226>.

ANTOLOVICH, Michael et al. Methods for testing antioxidant activity.**Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.

AOYAGI, T. et al. Cancer cachexia, mechanism and treatment. World journal of gastrointestinal oncology, v. 7, n. 4, p. 17–29, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4398892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

BABAEI, Z. et al. Relationship of obesity with serum concentrations of leptin, CRP and IL-6 in breast cancer survivors. Journal of the Egyptian National Cancer Institute, v. 27, n. 4, p. 223–229, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2015.09.001>.

BARONE, I. et al. Leptin, obesity and breast cancer: progress to understanding the molecular connections. Current Opinion in Pharmacology, v. 31, p. 83–89, 2016.

BASSETT, J. K. et al. Plasma phospholipids fatty acids, dietary fatty acids, and breast cancer risk. Cancer Causes & Control, v. 27, n. 6, p. 759–773, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-016-0753-2>.

BHATELIA, K.; SINGH, K.; SINGH, R. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. Cellular Signalling, v. 26, n. 11, p. 2350–2357, 2014.

BLAUWHOFF-BUSKERMOLEN, S. et al. The influence of different muscle mass measurements on the diagnosis of cancer cachexia. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, v. 8, n. 4, p. 615–622, 2017.

BODAI, B. I. et al. Lifestyle Medicine: A Brief Review of Its Dramatic Impact on Health and Survival. The Permanente Journal, v. 22, p. 17–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7812/TPP/17-025>.

BRASIL, I. N. DE C. J. DE A. G. DA S.-I. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.

BROMBERG, J.; WANG, T. C. Inflammation and Cancer: IL-6 and STAT3 Complete the Link. Cancer Cell, v. 15, n. 2, p. 79–80, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.009>.

BURDGE, GC. CALDER, P. Conversion of α-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. Reproduction, nutrition, development, artigo é um, mas os dados são outros, v. 45, n. 6, p. 581=597, 2005.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology? British Journal of Clinical Pharmacology, v. 75, n. 3, p. 645–662, 2013.

CAMARGO, C. et al. Fish oil supplementation during chemotherapy increases posterior time

to tumor progression in colorectal cancer Fish oil supplementation during chemotherapy increases posterior time to tumor progression in colorectal cancer. Nutrition and cancer, v. 5581, n. December, p. 1–7, 2015.

CAO, J. et al. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. Clinical Chemistry, v. 52, n. 12, p. 2265–2272, 2006.

CASTELL, G. S.; SERRA-MAJEM, L.; RIBAS-BARBA, L. ¿Qué y cuánto comemos? Método de recuerdo 24 horas. Nutricion Hospitalaria, v. 31, p. 46–48, 2015.

CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. ROS in Cancer: The Burning Question. Trends in Molecular Medicine, v. 23, n. 5, p. 411–429, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.03.004>.

CHOI, H.; YIM, J. Effects of Erythrocyte Membrane Polyunsaturated Fatty Acids in Overweight , Obese , and Morbidly Obese Korean Women. Journal of Cancer Prevention, v. 22, n. 3, p. 182–188, 2017.

CORRÊA, L. H. et al. Adipocytes and macrophages interplay in the orchestration of tumor microenvironment: New implications in cancer progression. Frontiers in Immunology, v. 8, n. SEP, p. 1–12, 2017.

CORSETTO, P. A. et al. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. Lipids in Health and Disease, v. 10, n. 1, p. 73, 2011. Disponível em: <http://www.lipidworld.com/content/10/1/73>.

CRAWFORD, S. Anti-inflammatory/antioxidant use in long-term maintenance cancer therapy: a new therapeutic approach to disease progression and recurrence. Therapeutic Advances in Medical Oncology, v. 6, n. 2, p. 52–68, 2014. Disponível em: <http://tam.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1758834014521111>.

CRESPI, E.; BOTTAI, G.; SANTARPIA, L. Role of inflammation in obesity-related breast cancer. Current Opinion in Pharmacology. [S.l: s.n.]. , 2016

DENG, T. et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. [S.l: s.n.], 2016. v. 11. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012615-044359>.

DUTTA, P. et al. MCP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancers and drives cancer invasiveness and metastasis. Breast Cancer Research and Treatment, v. 170, n. 3, p. 477–486, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4760-8>.

ELINE, C.; ERARD, G.; BROWN, K. A. Obesity and breast cancer e Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. 2017.

ELLEGAARD, P. K.; POULSEN, H. E. Tobacco smoking and oxidative stress to DNA: A meta-analysis of studies using chromatographic and immunological methods. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, v. 76, n. 2, p. 151–158, 2016.

ESCRICH, E.; SOLANAS, M.; MORAL, R. Advances in nutrition and dietetics. Advances in Nutrition and Cancer, CAncer Treatment and REsearch, v. 159, p. 289–309, 2014.

FEARON, K. et al. Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. The Lancet Oncology, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7>.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? Free Radical Biology and Medicine, v. 104, n. January, p. 144–164, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>.

GAUDET, M. M. et al. Waist circumference, body mass index, and postmenopausal breast cancer incidence in the Cancer Prevention Study-II Nutrition Cohort. Cancer Causes and Control, v. 25, n. 6, p. 737–745, 2014.

GIBSON, R. S.; CHARRONDIERE, U. R.; BELL, W. Measurement Errors in Dietary

Assessment Using Self-Reported 24-Hour Recalls in Low-Income Countries and Strategies for Their Prevention. Advances in Nutrition: An International Review Journal, v. 8, n. 6, p. 980–991, 2018.

GOSWAMI, B. et al. Breast cancer: Interaction between oxidant-antioxidant dynamics and inflammation in Indian females. Cancer Biomarkers, v. 6, n. 2, p. 95–103, 2009.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. Cell, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2866629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GU, L. et al. Serum adiponectin in breast cancer. Medicine, v. 97, n. 29, p. e11433, 2018.

HAMIDULLAH; CHANGKIJA, B.; KONWAR, R. Role of interleukin-10 in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, v. 133, n. 1, p. 11–21, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HIDAKA, B. H. et al. An empirically derived dietary pattern associated with breast cancer risk is validated in a nested case-control cohort from a randomized primary prevention trial. Clinical Nutrition ESPEN, v. 17, p. 8–17, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2016.10.008>.

HIDAKA, B. H. et al. Omega-3 and omega-6 fatty acids in blood and breast tissue of high-risk women and association with atypical cytomorphology. Cancer Prevention Research, v. 8, n. 5, p. 359–364, 2015.

HIMBERT, C. et al. Signals from the adipose microenvironment and the obesity-cancer link-a systematic review. Cancer Prevention Research, v. 10, n. 9, p. 494–506, 2017.

HIMMETOGLU, S. et al. DNA Oxidation and Antioxidant Status in Breast Cancer. Journal of Investigative Medicine, v. 57, n. 6, p. 720–723, 2009.

HINTZE, K. J.; TAWZER, J.; WARD, R. E. Concentration and ratio of essential fatty acids influences the inflammatory response in lipopolysaccharide challenged mice. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, v. 111, p. 37–44, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2016.03.003>.

HIRKO, K. A. et al. Erythrocyte membrane fatty acids and breast cancer risk: a prospective analysis in the nurses' health study II. International Journal of Cancer, v. 142, n. 6, p. 1116–1129, 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.31133>.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. Molecular Cancer, v. 12, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <Molecular Cancer>.

HORTOBAGYI, G. N. et al. AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition: Breast. [S.l: s.n.], 2017. v. 39. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44697161%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1586/14737140.6.10.1355%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=14737140&id=doi:10.1586/14737140.6.10.1355&atitle=Refining+the+postmenop>.

HUANG, C. W. et al. Role of n-3 polyunsaturated fatty acids in ameliorating the obesity-induced metabolic syndrome in animal models and humans. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 10, 2016.

HULLEY, Stephen B. et al. Delineando a pesquisa clínica. 4. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2015.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Situação do câncer no Brasil- Sobrevida, estadiamento, relação incidência/ mortalidade. Pg. 70. – Rio de janeiro. INCA, 2006. Disponível em:

< http://www1.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_sobrevida.pdf>. Acesso em 04 set. 2019.

INCA- Instituto Nacional do Câncer Jose de Alencar. O que é câncer. Ministério da Saúde, INCA, 2019. Disponível em: https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em 31 ago. 2019.

IYENGAR, N. M.; HUDIS, C. A.; DANNENBERG, A. J. Obesity and Cancer: Local and Systemic Mechanisms. Annual Review of Medicine, v. 66, n. 1, p. 297–309, 2015. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-med-050913-022228>.

JAKOVCEVIC, D. et al. Breast Cancer Molecular Subtypes and oxidative DNA damage. Appl Immunohistochem Mol Morphol, v. 23, n. 10, p. 1–6, 2015. Disponível em: <http://ww5.komen.org/BreastCancer/SubtypesofBreastCancer.html>.

JEON, M. et al. Elevated IL-1β expression induces invasiveness of triple negative breast cancer cells and is suppressed by zerumbone. Chemico-Biological Interactions, v. 258, p. 126–133, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.08.021>.

JIANG, X.; SHAPIRO, D. The immune system and inflammation in breast cancer. Mol Cell Endocrinol, v. 25, n. 382, p. 673–682, 2014.

JIMÉNEZ-GARDUÑO, A. M. et al. IL-1β induced methylation of the estrogen receptor ERα gene correlates with EMT and chemoresistance in breast cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 490, n. 3, p. 780–785, 2017.

JINJUVADIA, R. et al. Hepatocellular Carcinoma: A Decade of Hospitalizations and Financial Burden in the United States. The American journal of the medical sciences, v. 354, n. 4, p. 362–369, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjms.2017.05.016>.

JONES, M. E. et al. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. Breast Cancer Research, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2017.

KARIHTALA, P. et al. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. BMC Cancer, v. 11, n. 1, p. 262, 2011. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/262>.

KARNOFSKY DA et al. The use of nitrogen mustard in the palliative treatment of carcinoma. **Cancer** 1948,1:634-656.

KAWANISHI, S. et al. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 8, 2017.

KUBO, Y. et al. Skeletal muscle loss and prognosis of breast cancer patients. Supportive Care in Cancer, v. 25, n. 7, p. 2221–2227, 2017.

KUBOTA, Y. et al. Serum polyunsaturated fatty acid composition and serum high-sensitivity C-reactive protein levels in healthy Japanese residents: The KOBE study. Journal of Nutrition, Health and Aging, v. 19, n. 7, p. 719–728, 2015.

KURIKI, K. et al. Breast cancer risk and erythrocyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese. International Journal of Cancer, v. 121, n. 2, p. 377–385, 2007.

LAVIANO, A. et al. Omega-3 fatty acids in cancer. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, v. 16, n. 2, p. 156–161, 2013. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00075197-201303000-00007>.

LEE, K. R. et al. Waist circumference and risk of breast cancer in Korean women: A nationwide cohort study. International Journal of Cancer, v. 142, n. 8, p. 1554–1559, 2018.

LENIHAN-GEELS, G.; BISHOP, K.; FERGUSON, L. Cancer Risk and Eicosanoid Production: Interaction between the Protective Effect of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Genotype. Journal of Clinical Medicine, v. 5, n. 2, p. 25, 2016. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2077-0383/5/2/25>.

LI, Y. et al. Relationship between IL-10 expression and prognosis in patients with primary breast cancer. Tumor Biology, v. 35, n. 11, p. 11533–11540, 2014.

LIANG, J.; SHANG, Y. Estrogen and Cancer. Annual Review of Physiology, v. 75, n. 1, p. 225–240, 2013.

LIU, J.; MA, D. The Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. Nutrients, v. 6, n. 11, p. 5184–5223, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6643/6/11/5184/>.

LOPES, J. M. et al. The cost of cancer treatment in Portugal. Ecancer medical science, v. 11, p. 1–10, 2017.

LUBOWICKA, E. et al. Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients. BioMed Research International, v. 2018, p. 1–9, 2018.

MACCIÒ, A. et al. Correlation of body mass index and leptin with tumor size and stage of disease in hormone-dependent postmenopausal breast cancer: Preliminary results and therapeutic implications. Journal of Molecular Medicine, v. 88, n. 7, p. 677–686, 2010.

MACCIO, A.; MADEDDU, C. Inflammation and ovarian cancer. Cytokine, v. 58, n. 2, p. 133–147, 2012.

MADEDDU, C. et al. Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer. Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 18, n. 12, p. 2519–2529, 2014.

MANNI, A.; EL-BAYOUMY, K.; THOMPSON, H. Docosahexaenoic acid in combination with dietary energy restriction for reducing the risk of obesity related breast cancer. International Journal of Molecular Sciences. [S.l: s.n.]. , 2018

MANSARA, P. et al. Improved antioxidant status by omega-3 fatty acid supplementation in breast cancer patients undergoing chemotherapy: a case series. Journal of medical case reports, v. 9, p. 148, 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4486087&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MANSOORI, A. A.; JAIN, S. K. Molecular Links between Alcohol and Tobacco Induced DNA Damage, Gene Polymorphisms and Patho-physiological Consequences: A Systematic Review of Hepatic Carcinogenesis. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 16, n. 12, p. 4803–4812, 2015.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. Revista de Nutrição, v. 19, n. 6, p. 761–770, dez. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732006000600011&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 31 maio 2017.

MARTÍNEZ-REZA, I.; DÍAZ, L.; GARCÍA-BECERRA, R. Preclinical and clinical aspects of TNF-α and its receptors TNFR1 and TNFR2 in breast cancer. Journal of Biomedical Science, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2017.

MASJEDI, A. et al. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 108, n. September, p. 1415–1424, 2018.

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents Med Chem,** v. 8, n. 8, p. 872-85, Dec 2008.

MINATOYA, M. et al. Relationship of serum isoflavone, insulin and adiponectin levels with breast cancer risk. Breast Cancer, v. 22, n. 5, p. 452–461, 2015.
MOCELLIN, M. C. et al. Fish oil decreases C-reactive protein/albumin ratio improving nutritional prognosis and plasma fatty acid profile in colorectal cancer patients. Lipids, v. 48, n. 9, p. 879–888, 2013.
MOLFINO, A. et al. Effect of oral docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on DHA levels and omega-3 index in red blood cell membranes of breast cancer patients. Frontiers in Physiology, v. 8, n. JUL, p. 1–7, 2017.
MOLFINO, A. et al. The role of docosahexaenoic acid (DHA) in the control of obesity and metabolic derangements in breast cancer. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 4, 2016.
MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. Seminars in Cell and Developmental Biology, v. 80, p. 50–64, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>.
MONK, J. M. et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids and mechanisms to mitigate inflammatory paracrine signaling in obesity-associated breast cancer. Nutrients, 2014.
MORO, K. et al. Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. World Journal of Clinical Cases, v. 4, n. 7, p. 155, 2016. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v4/i7/155.htm>.
NAJAFI, F. et al. Productivity costs and years of potential life lost associated with five leading causes of death : Evidence from Iran (2006-2010). Medical Journal of the Islamic Republic of Iran, v. 30, p. 1–8, 2016.
NEIL-SZTRAMKO, S. E. et al. Does obesity modify the relationship between physical activity and breast cancer risk? Breast Cancer Research and Treatment, p. 1–15, 2017.
NOUR ELDIN, E. E. M. et al. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a Discriminatory Biomarker for Early Detection of Breast Cancer. Clinical Breast Cancer, n. 2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.12.013>.
OFT, M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. Cancer Immunology Research, v. 2, n. 3, p. 194–199, 2014.
OH, K. et al. IL-1β induces IL-6 production and increases invasiveness and estrogen-independent growth in a TG2-dependent manner in human breast cancer cells. BMC Cancer, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2746-7>.
OMS 2018 – Organização Mundial da Saúde. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, OMS, 2018. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1 >. Acesso em 31 ago. 2019.
OMS. Índice de Massa Corporal. disponível em: <https://dms.ufpel.edu.br/static/bib/apoio/imc.pdf>, v. 85, p. 2000, 2000.
OPAS. Disco De Cálculo Para Adultos E Idosos. Disponível em: 2002. Disponível em:

<https://arquivos.sbn.org.br/uploads/sbn_dmr2017_disco_imc.pdf>.
CALDER et al., C. et al. A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. British Journal of Nutrition, v. 109, n. SUPPL. S1, p. S1–S34, 2013. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed14&NEWS=N&AN=368208253>.
PANDE, D. et al. Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. Translational Research, v. 160, n. 6, p. 411–418, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2012.07.005>.
PANIS, C. et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, v. 133, n. 3, p. 881–888, 2012.
PELEKANOU, V. et al. The estrogen receptor alpha-derived peptide ERalpha17p (P(295)-T(311)) exerts pro-apoptotic actions in breast cancer cells in vitro and in vivo, independently from their ERalpha status. **Mol Oncol,** v. 5, n. 1, p. 36-47, Feb 2011.
RAHROVANI, F. et al. Erythrocyte membrane saturated fatty acids profile in newly diagnosed Basal Cell Carcinoma patients. Clinical Nutrition {ESPEN}, v. 7, n. 1, p. 21–30, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405457717304345>.
ROCKENBACH, G. et al. Ingestión dietética y estrés oxidativo en cáncer de mama: Antes y después del tratamiento. Nutricion Hospitalaria, v. 26, n. 4, p. 737–744, 2011.
SIGHOKO, D. et al. Breast cancer in pre-menopausal women in West Africa: Analysis of temporal trends and evaluation of risk factors associated with reproductive life. Breast, v. 22, n. 5, p. 828–835, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2013.02.011>.
SIMOPOULOS, A. P. An increase in the Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. Nutrients, v. 8, n. 3, p. 1–17, 2016.
STRAKA, S. et al. Incorporation of eicosapentaenioic and docosahexaenoic acids into breast adipose tissue of women at high risk of breast cancer: A randomized clinical trial of dietary fish and n-3 fatty acid capsules. Molecular Nutrition & Food Research, v. 59, n. 9, p. 1780–1790, 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201500161>.
SULLIVAN, CC; LOPRINZI, CL; HADDAD, T. Updates in the Evaluation and Management of Breast Cancer. Mayo Clinic, v. 93, n. 6, p. 794–807, 2018.
SUN, Y. S. et al. Risk factors and preventions of breast cancer. International Journal of Biological Sciences, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.
TÖKÉS, T. et al. Prognostic and Clinicopathological Correlations of Cell Cycle Marker Expressions before and after the Primary Systemic Therapy of Breast Cancer. Pathology & Oncology research, 2019.
TSAI, C. H. et al. Docosahexaenoic acid increases the expression of oxidative stress-induced growth inhibitor 1 through the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway in breast cancer cells. Food and Chemical Toxicology, v. 108, p. 276–288, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.08.010>.
TSOUKAS, M. A. et al. Dietary walnut suppression of colorectal cancer in mice: Mediation by miRNA patterns and fatty acid incorporation. Journal of Nutritional Biochemistry, v. 26, n. 7, p. 776–783, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.02.009>.
VARA-MESSLER, M. et al. Increased dietary levels of α-linoleic acid inhibit mammary tumor

growth and metastasis. European Journal of Nutrition, v. 56, n. 2, p. 509–519, 2017.
VIEIRA, F. et al. Factors associated with oxidative stress in women with breast cancer. Nutricion Hospitalaria, v. 26, n. 3, p. 528- 536 9p, 2011. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=rzh&AN=104579344&site=ehost-live>.
VILLASEÑOR, ADRIANA. BARBASH-BALLARD, R. BAUMGATNER, K. BAUMGARTNER, R. BERNSTEIN, L. MCTIERNAN, A. NEUHOUSER, M. Prevalence and prognostic effect of sarcopenia in breast cancer survivors: the HEAL Study. J Cancer Surviv, v. 6, n. 4, p. 398–406, 2012.
VONA-DAVIS, L.; ROSE, D. P. The obesity-inflammation-eicosanoid axis in breast cancer. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 18, n. 3–4, p. 291–307, 2013.
ZÁRATE, R. et al. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. Clinical and Translational Medicine, v. 6, n. 1, p. 25, 2017. Disponível em: <http://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-017-0153-6>.
ZHAO, S. et al. Serum IL-10 predicts worse outcome in cancer patients: A meta-analysis. PLoS ONE, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.
ZHENG, Z. et al. PUFA diets alter the microRNA expression profiles in an inflammation rat model. Molecular Medicine Reports, v. 11, n. 6, p. 4149–4157, 2015.
ZHUANGWEI, L. et al. Association of serum interleukin-10, interleukin-17A and transforming growth factor-α levels with human benign and malignant breast diseases. Experimental and Therapeutic Medicine, v. 15, n. 6, p. 5475–5480, 2018.

ANEXO 1

Termo de Consentimento livre e esclarecido

Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública Av. Dr. Arnaldo, 715 – CEP 01246-904 – São Paulo – Brasil

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa: PAPEL DA ADIPOSIDADE SOBRE A INFLAMAÇÃO, OXIDAÇÃO E ADIPOCITOCINAS NA NEOPLASIA MAMÁRIA.

O motivo que nos leva a estudar o problema da obesidade é o desenvolvimento do câncer de mama, o grande número de indivíduos com esse diagnóstico e sua relação com o excesso de peso. A pesquisa se justifica pela necessidade de avaliar quais fatores podem contribuir para o desenvolvimento dessa doença em mulheres com excesso de peso. Portanto, o objetivo desse projeto é identificar possíveis fatores presentes no excesso de peso e de gordura corporal que possam influenciar no desenvolvimento do câncer de mama. A coleta de material será da seguinte forma: será coletada uma amostra de sangue (20ml) e também será aplicado um questionário sobre seu nível socioeconômico, cultural e clínico.

Existem desconfortos e risco mínimo que envolvem enjoos em função do jejum e pequenos hematomas no local de punção, ambos relacionados a coleta de material. Os resultados obtidos através desse projeto trarão benefícios às pacientes sobreviventes de câncer de mama no momento em que mostrarem a obesidade como fator de risco e incentivarem políticas públicas de orientações sobre alimentação saudável, redução de peso e de gordura corporal.

Em caso de evidências de risco a saúde pelos resultados encontrados as participantes serão orientadas a procurar o atendimento de um nutricionista.

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e recusar em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Sua identidade será mantida em sigilo e sob a responsabilidade dos pesquisadores. Os resultados dos exames serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos e você também não será beneficiada com nenhuma compensação financeira.

Eu, fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A pesquisadora Sara Maria Moreira Lima Verde certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que todos os gastos estão inclusos no orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Sara Maria Moreira Lima Verde ou o(a) professor(a) orientador(a) Profa. Dra. Nagila Raquel Teixeira Damasceno no telefone (11) 3061-7865 ou os Comitês de Ética em Pesquisa (COEP) identificados abaixo:

COEP da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sito à Av. Dr. Arnaldo, 715, Cerqueira César – São Paulo, SP. Telefone: (11) 3061.7779.

COEP do Hospital Geral de Fortaleza, sito à Rua Ávila Goulart, 900, Papicu

– Fortaleza, Ce. Telefone: (85).3101.7078.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e fui esclarecida sobre minhas dúvidas

Nome	Assinatura do Participante	Data

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data

ANEXO 2

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA CULTURAL, CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA

AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA CULTURAL, CLÍNICA E ANTROPOMÉTRICA	**NÚMERO PRONTUÁRIO:** _____ **DATA DA COLETA:** ___/ /___
1. B1 **AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA**	
B1.1 **Nome:**	B1.2 **Idade:**
Endereço:	
Telefone: Res - Cel. - Trab. -	
B1.3 **Estado civil** 1( )Casada 2( )Solteira 3( )Viúva 4( )Divorciada 5( )Outros	B1.4 **Etnia*** 1( )Branco 2 ( )Amarelo 3( )Pardo 4 ( )Negro 5( )Indígena
B1.5 **Escolaridade:** 1( )Ensino fundamental incompleto – 4ª série 5( )Superior incompleto 2( )Ensino fundamental completo – 8ª série 6( )Superior completo 3( )Ensino médio incompleto 7( )Outros 4( )Ensino médio completo – 3º ano	
B16 **Renda familiar *per capita*:** 1( )< 1 SM 2( )2┤6 SM 3( )7┤10 SM 4( )> 10 SM	
B1.7 **Menarca:** anos B1.8 **Menopausa:** anos B1.9 **DUM:** B1.10 **TRH:** ( )Não ( )Sim	
B1.11 **Nuliparidade:** ( )Não ( )Sim B1.12 **Amamentação** ( )Não ( ) Sim	

B1.13 **Fumo**: 1( )Não 2( )Fuma (atual) Tempo:_____3( )Fumou (anterior) Tempo: _____

B1.14 **Álcool**: 1( )Não 2( )Consome bebida alcoólica (atual) 3( )Consumiu Quantidade: _____*

*>150ml para mulheres = consumo prejudicial à saúde (Sociedade Brasileira de Hipertensão, 2006)

B1.15 **Antecedentes familiares de câncer:** 1( )Não 2( )Sim B1.16 **Localização** 1( )Mama 2 ( )Outros

B1.17 **Quem**: 1( ) Mãe 2( ) Irmã 3( )Avó 4( )Tia

2. B2 **AVALIAÇÃO CLÍNICA**

Diagnóstico: Neoplasia mamária B2.1 **SUBTIPO**: 1( )Lobular 2( )Ductal

B2.2 **TNM:** T____N____M_____ B2.3 **Estadiamento clínico (EC):** 1( )EC I 2( )EC II 3( )EC III

B2.4 **Tamanho do tumor**:_____ B2.5 **Linfonodos comprometidos:** 1.( )S^- 2. ( )N

Total: _____

B2. 6 **Metástase:** 1. ( )M^- 2.( )M^+ B2.7 **Grau histopatológico:**_____

3. B3 **AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA**

B3.1 Peso atual(kg):	B3.2 Peso habitual(kg):	
B3.3 Altura(m):	B3.4 IMC:	B3.5 CC:
B3.6 Reactância (Xc):	B3.7 Resistência (R):	
B3.8 % água:	B3.9 % gordura:	B3.10 % massa magra:
B3.11 Ângulo de fase:	B3.12 TMB:	

*Fonte: IBGE, senso demográfico 2002

ANEXO 3

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Faculdade de Saúde Pública
Universidade de São Paulo

OF.COEP/209/12

27 de novembro de 2012.

Prezadas pesquisadora e orientadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, em sua **10.ª/12 Sessão Ordinária**, realizada em **23/11/2012**, analisou de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º **2162**, intitulado "**OBESIDADE E CÂNCER DE MAMA: AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO EXCESSO DE PESO E TECIDO ADIPOSO**", do **grupo III**, sob responsabilidade da pesquisadora **Sara Maria Moreira Lima Verde** e orientação da Professora **Nágila Raquel Teixeira Damasceno,** considerando **APROVADO** a inclusão de novas análises no projeto.

Cabe lembrar que, de acordo com a Res. CNS 196/96, são deveres do(a) pesquisador(a): **1)** Comunicar de imediato qualquer alteração no projeto e aguardar manifestação deste Comitê de Ética em Pesquisa para dar continuidade à pesquisa; **2)** Manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 (cinco) anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo COEP, no caso eventual auditoria; **3)** Comunicar formalmente a este Comitê por ocasião do encerramento da pesquisa; **4)** Elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **5)** Justificar perante o COEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Claudio Leone
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª
Prof.ª Dr.ª **Nágila Raquel Teixeira Damasceno**
Departamento de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública/USP

ANEXO 4

GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Saúde - SESA

SUS Sistema Único de Saúde

SECRETARIA ESTADUAL DA SAÚDE / SUS
HGF HOSPITAL GERAL DE FORTALEZA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/HGF

Fortaleza, 06 de maio 2010.

Illma. Sra.
Pesquisadora: **Sara Maria Moreira Lima Verde**
Projeto Intitulado**: Obesidade e câncer de mama: Avaliação dos fatores de riscos associados ao excesso de peso e tecido adiposo**
Área de conhecimento**: Ciências da Saúde / Nutrição**
Data da entrada no CEP: **13/04/10**
Protocolo do CEP: **050507/10**

O Comitê de Ética em Pesquisa do HGF em reunião ordinária no dia 05/05/10 analisou e considerou o referido projeto **APROVADO,** pois atende as recomendações da Resolução nº 196/96do CNS/MS.

Lembramos ao pesquisador o cumprimento da Resolução do CNS 196/96 na condução cientifica do seu projeto e ainda, o encaminhamento ao CEP do relatório da pesquisa bem como à devolução dos resultados à comunidade.

Atenciosamente,

Drª. Maria Veraci Oliveira Queiroz
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/HGF

ANEXO 5

Índice de performance de *Karnofsky***.**

ESCORE		*DESCRIÇÃO*
1	100	Normal
2	90	Capaz de realizar atividades normais. Sem sinais ou sintomas de doenças
3	80	Realiza atividades normais com proeza.
4	70	Cuida de si próprio, capaz de realizar atividades normais e trabalhar.
5	60	Requer assistência ocasional, mas é capaz de cuidar da maioria das suas próprias atividades.
6	50	Requer considerável assistência e cuidados médicos frequentes
7	40	Incapaz, requer cuidados especiais e assistência.
8	30	Severamente incapaz, indicação de hospitalização em morte iminente.
9	20	Muito doente, hospitalização necessária, necessidade de tratamento de suporte ativo.

ANEXO 6

Primeira página do currículo Lattes do orientando

CNPq — Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Currículo Lattes

English | XML | ?

Dados gerais | Formação | Atuação | Projetos | Produções | Inovação | Educação e Popularização de C & T | Eventos | Orientações | Bancas | +

Bruno Aparecido Dantas de Araujo

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/7975688904703353

Última atualização do currículo em 29/03/2019

Graduado em nutrição pela Faculdade de Saúde Pública FSP da Universidade de São Paulo USP, Brasil em 12/15 com período de intercâmbio em Friedrich Schiller Universität Jena, Alemanha por meio do Programa Ciências sem Fronteiras durante 14 meses. Participou do programa de Aprimoramento em Nutrição Hospitalar do Hospital Universitário da USP em parceria com a Secretaria de Saúde de São Paulo. Atualmente é mestrando pelo Programa Interunidades (FCF/FSP/FEA) da Universidade de São Paulo em Nutrição Humana Aplicada. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Bruno Aparecido Dantas de Araujo

Nome em citações bibliográficas ARAUJO, B. A. D.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em andamento em Nutrição Humana Aplicada (Conceito CAPES 3).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Associação dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 com parâmetros inflamatórios e estresse oxidativo em mulheres com câncer de mama: Impacto do estadiamento clínico,Orientador: Nágila Raquel Teixeira Damasceno.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: ômega três; inflamação; estresse oxidativo; câncer de mama.
Grande área: Ciências da Saúde

2009 - 2015 Graduação em nutrição.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Formação Complementar

2016 - 2017 Aprimoramento profissional em Nutrição Hospitalar.
Hospital Universitário da USP, HU/USP, Brasil.

2013 - 2013 alemão como língua estrangeira. (Carga horária: 160h).
Friedrich-Schiller-Universität Jena, UNI/Jena, Alemanha.

ANEXO 7

Primeira página do currículo Lattes do orientador

CNPq — Currículo Lattes — English

Dados gerais | Formação | Atuação | Projetos | Produções | Inovação | Eventos | Orientações | Bancas | Citações | +

Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/8729581028091781

Última atualização do currículo em 04/03/2019

Professora Associada do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública (USP) e responsável pelo grupo de pesquisa em Oxidações Biológicas e Metabolismo Lipídico. Nos últimos anos tem coordenado pesquisas na área de Nutrição e Doenças Crônicas (DCV, Obesidade, Câncer, Epilepsia e Doenças Neurodegenerativas), com ênfase em aspectos lipídicos, oxidativos e inflamatórios modulados pelos ácidos graxos ômega-3. É diretora da Divisão de Nutrição e Dietética do Hospital Universitário (HU-USP), membro da diretoria do Departamento de Nutrição da SOCESP, conselheira científica do Conselho Regional de Nutrição (CRN3), membro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT-FCx) e membro do conselho deliberativo do Núcleo de Apoio à Pesquisa de Fluidos Complexos (NAP-FCx), além de fazer parte de comissões da Universidade de São Paulo (Biossegurança, Graduação en Nutrição, Cultura e Extensão e Residência Multiprofissional da FSP). Desde 2014 coordena o Programa de Cooperação Internacional Brasil - Suecia (CAPES-STINT), além de possuir parceria com grupos de pesquisa nacionais (UFPI, UECE, UNIFOR, UFC, UFF) e estrangeiros (Harvard University e Universidade de Barcelona). Possui Graduação em Nutrição pela Universidade Estadual do Ceará (1995), Mestrado (1997) e Doutorado (2001) em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo. Realizou estágios de Pós-doutoramento em Imunologia (USP, 2004) e Nutrição e Endocrinologia (Universidade de Barcelona, Espanha, 2010). **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Nágila Raquel Teixeira Damasceno

Nome em citações bibliográficas DAMASCENO, N. R. T.;DAMASCENO, NAGILA RAQUEL TEIXEIRA;DAMASCENO, N.R.T.;DAMASCENO, NÁGILA RAQUEL TEIXEIRA;DAMASCENO, NÁGILA R;DAMASCENO, NÁGILA R.;Damasceno NR;DAMASCENO, NR;Damasceno NRT

Endereço

Endereço Profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
Av. Dr. Arnaldo, 715
Pacaembu
01246-904 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30617865
Fax: (011) 30617701
URL da Homepage: http://www.usp.br

Formação acadêmica/titulação

1997 - 2001 Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Influência das Isoflavonas Extraídas da Soja na Hipercolesterolemia e na Aterosclerose Experimental Induzida pela Caseína, Ano de obtenção: 2001.
Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: Isoflavonas; Caseína; Oxidação; Lipoproteínas; Anticorpos; Aterosclerose.
Grande área: Ciências da Saúde
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Alergologia e Imunologia Clínica.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Clínica Médica / Especialidade: Endocrinologia.

Anexo 8

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Interunidades em Nutrição Humana Aplicada
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

89131 - 5876685/1 - Bruno Aparecido Dantas de Araújo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HNT5758-2/2	Doenças Crônicas não Transmissíveis do Espectro da Síndrome Metabólica: Fisiopatologia, Epidemiologia e Controle (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) (2)	08/03/2016	11/04/2016	30	2	87	A	N	Concluída
FBA5899-3/1	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	01/03/2017	11/04/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5712-6/3	Fisiologia da Nutrição I (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	02/03/2017	12/04/2017	90	6	90	A	N	Concluída
EAE5927-5/4	Economia da Saúde e Desenvolvimento Econômico (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	10/03/2017	30/06/2017	120	8	80	A	N	Concluída
HNT5711-7/1	Recursos Alimentares para Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/08/2017	24/08/2017	30	2	80	A	N	Concluída
HNT5709-6/1	Dietas e Doenças Crônicas não Transmissíveis (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/08/2017	30/08/2017	30	2	90	A	N	Concluída
EAE5876-5/5	Economia da Alimentação e Nutrição (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	07/08/2017	15/12/2017	120	8	88	A	N	Concluída
FBA5728-4/5	Aprimoramento Pedagógico (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)	12/09/2017	10/10/2017	60	4	86	A	N	Concluída
MCM5923-1/2	Mecanismos de Carcinogênese (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/10/2017	30/10/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	20	25	38
Estágios:			
Total:	20	25	38

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Unidades de Ensino responsáveis pelo programa: Faculdade de Saúde Pública - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Escola de Artes, Ciências e Humanidades..

2) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

Conceito a partir de 02/01/1997:

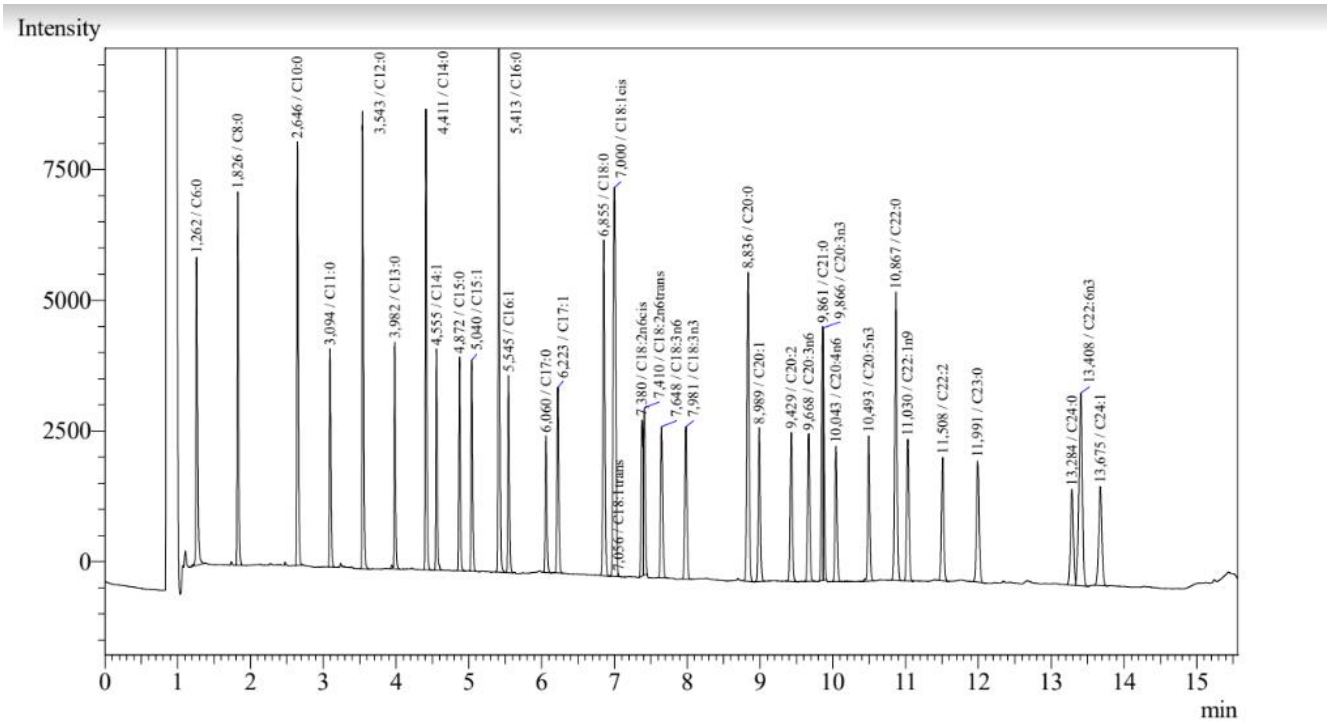
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 26/05/2019 18:48:48

Anexo 9

Curva da Cromatografia a Gás



1. APENDICE

O seguinte trabalho originará um artigo intitulado “EPA AND DHA FATTY ACIDS MODULATE TUMOR SIZE BY INFLAMMATORY RESPONSE IN BRAZILIAN
WOMEN WITH BREAST CANCER”, que está em fase final de preparo. Pretende-se submetê-lo na revista na revista *International Journal of Cancer* (https://onlinelibrary.wiley.com/journal/10970215).
Por motivo de direitos autorais, será disponibilizado a seguir somente o resumo do artigo.

EPA AND DHA FATTY ACIDS MODULATE TUMOR SIZE BY INFLAMMATORY RESPONSE IN BRAZILIAN WOMEN WITH BREAST CANCER

Bruno A.D. Araujo[1], Sara M.M.L. Verde [2], Isabelle Novelli [1], Nágila R.T. Damasceno[1]

[1]Department of Nutrition, Faculty of Public Health, University of Sao Paulo, SP, Brazil.
[2]State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most incident cancer in women worldwide. The essential fatty acids polyunsaturated omega 3 series are associated with disease prevention, reduction of inflammatory status and impact at tumor size. This is a case-control, observational study with 87 women with BC and 100 controls recruited at General Hospital of Fortaleza (Northeast Brazil) between 2011 and 2012. Women with BC were divided into 2 groups according to clinical stage (Low- 0-II, High- IIa-IIIc). By blood sample were analyzed cytokines and concentration of omega 3 and 6 on erythrocyte membrane. Odds ratios and significance ($p<0,05$) were calculated using logistic regression: smoking, menopause status and age were used as adjustment. Ductal tumor type was the most frequent (79.3%). Cytokines MCP-1 (357.8 versus 295.8 pg / mL) was different between case and control, whereas TNF-α (30.9 versus 29.3 pg / mL) was similar. Controls had higher concentrations of IL-6 (1.6 versus 0.9 pg / mL) and IL-10 (5.5 versus 2.8 pg / mL) than BC group, whereas IL-1β was elevated in the case (2.8 pg/ mL) compared to control (1.3 pg / mL). Both Low and High groups were similar when those cytokines were analyzed. In ratios between MCP-1, TNF-α, IL-1β, IL-6 with IL-10 all control had lower values than case, but there were not differences between Low and High groups. The concentration of omega 3 acids in the membrane was measured only in the Case group. There was difference only in the DHA acid concentration between Low (4.0 ± 1.3%) and High (3.4±1.3%, p: 0.020) and the linoleic acid/DHA (Low 3.0 ± 1) and (High 3.6 ± 1.5 p: 0.015). High values of IL10 (≥4.18 pg/mL) were associated with smaller tumor size (OR: 0.16, p:0.037). High DHA content (≥ 4.3%) was associated with high concentrations of IL-10 (OR:6.20, p: 0,023), whereas EPA, DHA and the sum of these were associated with low concentration of inflammatory cytokines, and linoleic and arachidonic acid with high concentrations of inflammatory markers. We can conclude that BC patients presented a higher inflammatory profile than disease free women. In addition, those with higher clinical staging had lower concentrations of omega 3 fatty acids. The erythrocyte content of n-3 was associated with a smaller tumor size and less inflammation.