

JONATHAN YUGO MAESAKA

Avaliação da densidade mamária com o uso de inteligência artificial por rede neural convolucional em mulheres na pós-menopausa com síndrome de Gilbert

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Coorientadora: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono

São Paulo

2021

JONATHAN YUGO MAESAKA

Avaliação da densidade mamária com o uso de inteligência artificial por rede neural convolucional em mulheres na pós-menopausa com síndrome de Gilbert

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

Coorientadora: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Maesaka, Jonathan Yugo
Avaliação da densidade mamária com o uso de
inteligência artificial por rede neural
convolucional em mulheres na pós-menopausa com
síndrome de Gilbert / Jonathan Yugo Maesaka. -- São
Paulo, 2021.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetria e Ginecologia.
Orientador: Edmund Chada Baracat.
Coorientadora: Suzane Kioko Ono.

Descritores: 1.Síndrome de Gilbert
2.Estrogênios/metabolismo 3.Neoplasias da mama
4.Densidade da mama

USP/FM/DBD-424/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos **meus pais**, por todo cuidado, carinho e dedicação incondicionais. Meus maiores exemplos de vida.

Às minhas irmãs **Nina** e **Juliane**, minhas companheiras de vida, fonte de companheirismo e compreensão.

À minha esposa **Juliana** e minha filha **Mari**, por toda paciência, incentivo e acolhimento. Por vocês, eu busco diariamente deixar o mundo melhor.

Agradecimentos especiais

Ao **Prof. Dr. Edmund Chada Baracat**, pelo estímulo a minha formação, pelas oportunidades, ensinamentos e orientação no desenvolvimento deste estudo.

À **Profa. Dra. Suzane Kioko Ono**, por toda dedicação na orientação dos seus alunos.

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. José Roberto Filassi**, pelas oportunidades e incentivos ao longo da minha carreira.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Maciel, Prof. Dr. José Maria Soares Junior e Dr. Rodrigo Gonçalves**, pela apreciação e sugestões oferecidas para esta pesquisa quando apresentada para Qualificação.

A todos os **assistentes do Setor de Mastologia**, por terem participado de minha formação e pela parceria nestes anos.

À **Profa. Katia Cândido Carvalho**, pelas pacientes orientações no LIM/58.

Aos **funcionários** do LIM/58, pela colaboração e vivência.

Aos **residentes e às preceptoras do Setor de Mastologia**, pelos esforços conjuntos na rotina do Hospital.

A minha amiga **Ana Maria Massad Costa**, pelo apoio incondicional e incentivo pessoal e profissional.

Às amigas **Gabriela Boufelli, Laura Penteado, Mila M. Miranda Zambone, Juliana Pierobon Cunha e Flavia Purcino**, pela parceria e apoio durante a execução desta pesquisa.

Aos **colaboradores e equipe de enfermagem das Divisões de Ginecologia e Gastroenterologia e Hepatologia Clínica** do Hospital das Clínicas, pela colaboração neste projeto.

À **Sra. Lucinda Cristina Pereira** e **Sra. Claudia Vieira**, do Programa de Pós-Graduação, pelo auxílio e atenção durante o desenvolvimento deste estudo.

A todas as **pacientes**, meu muito obrigado.

E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.

Erico Verissimo

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Quadros	
Lista de Tabelas	
Lista de Figura e Gráficos	
Resumo	
Summary	
1	Introdução
1.1	Síndrome de Gilbert..... 1
1.2	Diagnóstico clínico da Síndrome de Gilbert..... 2
1.3	Bases moleculares e genéticas da Síndrome de Gilbert..... 3
1.4	Câncer de mama..... 6
1.5	Papel do estrogênio e seus metabólitos na gênese do câncer de mama..... 9
1.6	Papel da UGT1A1 na carcinogênese da mama..... 11
1.7	Histórico da mamografia – invenção, desenvolvimento, importância clínica..... 12
1.8	Densidade mamária..... 14
1.9	Redes neurais..... 20
2	Objetivos
2.1	Objetivo geral..... 24
2.2	Objetivos específicos..... 24
3	Casuística e métodos
3.1	Aspectos Éticos..... 25
3.2	Desenho do estudo..... 25
3.3	Sujeitos..... 25
3.4	Crerios de inclusão e não-inclusão..... 26
3.5	Método de estudo..... 27
3.6	Sequenciamento da UGT1A1..... 27
3.7	Avaliação dos marcadores imagenológicos da mama para exposição ao estrogênio..... 29
3.8	Análise Estatística..... 30
4	Resultados 32
5	Discussão 48
6	Conclusões 56
7	Anexos 57
8	Referências 71

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de variância
BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CC	Crânio-caudal
CNN	<i>Convolutional neural network</i>
COMT	Catecol O-metiltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
E1	Estrona
E2	Estradiol
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
IARC	<i>International Association Cancer Registers</i>
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IIQ	Intervalo Interquartil
MAPK	Proteino-quinases ativadas por mitógenos
MLO	Médio-lateral oblíqua
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RE	Receptor de estrogênio
RE α	Receptor de estrogênio alfa
RE β	Receptor de estrogênio beta
RR	Risco Relativo
SG	Síndrome de Gilbert
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TFIID	Fator de transcrição IID
UGT1A1	Glucuronosiltransferase 1A1

Lista de Quadros

Quadro 1	Critérios diagnósticos da Síndrome de Gilbert.....	3
Quadro 2	Padrões de parênquima mamário conforme Wolfe.....	15
Quadro 3	Classificação de Tabár dos padrões de parênquima mamário.....	18
Quadro 4	Classificação da densidade mamária pelo BI-RADS®.....	19

Lista de Tabelas

Tabela 1	Genótipos associados à Síndrome de Gilbert.....	3
Tabela 2	Fatores de risco hormônio-relacionados para câncer de mama.....	7
Tabela 3	Questionário para aplicação do modelo de Gail.....	10
Tabela 4	Classificação de risco de acordo com o padrão de parênquima, descrito por Wolfe.....	16
Tabela 5	Risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama de acordo com a densidade mamográfica utilizando a classificação de Boyd e colaboradores.....	17
Tabela 6	Características sociodemográficas dos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	32
Tabela 7	Índice de massa corpórea, antecedentes pessoais, antecedentes familiares e tabagismo nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	33
Tabela 8	Bilirrubina total e frações direta (conjugada) e indireta (não-conjugada) séricas nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	36
Tabela 9	Densidades mamárias avaliadas por radiologistas, pelo avaliador <i>Histogram</i> e pela CNN nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	41
Tabela 10	Coeficiente de concordância das densidades mamárias avaliadas por radiologistas, pelo avaliador <i>Histogram</i> e pela CNN estratificado segundo grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	42
Tabela 11	Estimativas diagnósticas da CNN na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias.....	43
Tabela 12	Estimativas diagnósticas do <i>Histogram</i> na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias.....	46

Lista de Figura e Gráficos

Figura 1	Modelo evolutivo de carcinogênese.....	11
Gráfico 1	Risco de desenvolvimento de câncer de mama, em cinco anos e global (<i>lifetime risk</i>), calculado pelo índice de Gail...	34
Gráfico 2	Distribuição das medidas de bilirrubina total e frações nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	37
Gráfico 3	Densidade mamária na avaliação do radiologista de acordo nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	38
Gráfico 4	Densidade mamária pelo avaliador <i>Histogram</i> de acordo com os grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	39
Gráfico 5	Densidade mamária aferida pelo CNN de acordo com os grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.....	40

RESUMO

Maesaka JY. *Avaliação da densidade mamária com o uso de inteligência artificial por rede neural convolucional em mulheres na pós-menopausa com síndrome de Gilbert* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo”; 2021.

A síndrome de Gilbert (SG) é descrita como uma hiperbilirrubinemia indireta que ocorre na ausência de doenças hepáticas ou quadros hemolíticos. Apresenta, como principal manifestação clínica, episódios de icterícia intermitente. O aumento dos níveis séricos de bilirrubina em pacientes com SG ocorre devido à redução da atividade hepática da enzima bilirrubina-glucuroniltransferase a cerca de 30% do normal. Mudanças na via de glucuronidação podem justificar alterações no metabolismo de estrogênio e eventuais repercussões dessa exposição na mama. Procuramos avaliar a densidade mamária de mulheres na pós-menopausa com o emprego de mamografia e rede neural convolucional nesta população específica, com o propósito de identificar novas ferramentas para o seguimento das pacientes com essa síndrome. **OBJETIVOS:** Avaliar a densidade mamária com o uso de inteligência artificial por rede neural convolucional em mulheres na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert. **MÉTODOS:** Avaliação de 52 pacientes divididas em três grupos: grupo Síndrome de Gilbert composto por 12 pacientes, grupo controle genotipado formado por 9 pacientes, e Grupo controle não genotipado constituído por 31 pacientes. Todas foram submetidas a mamografia e análise por inteligência artificial utilizando *Convolutional Neural Network* (CNN). **RESULTADOS:** No grupo de pacientes SG com mamas densas (extremamente densas e heterogeneamente densas) a CNN apresentou sensibilidade de 57,14%, especificidade de 100%, com acurácia de 75%, comparado a sensibilidade e especificidade de 100% no grupo Controle genotipado, e sensibilidade de 44,44% e especificidade de 92,31% no grupo Controle não genotipado. O coeficiente de concordância *kappa* das densidades mamárias avaliadas por radiologistas e pela CNN foi de 0,381 para o grupo Síndrome de Gilbert, 0,700 para o grupo Controle genotipado e 0,291 para o grupo Controle não genotipado. **CONCLUSÃO:** A sensibilidade da CNN em identificar as mamas densas no grupo SG foi menor que a do grupo Controle genotipado e mais semelhante à do grupo Controle não genotipado. Quando comparada a avaliação da densidade mamária pelo radiologista, a CNN possui concordância mediana no grupo Controle genotipado, porém baixa concordância em pacientes com SG. Os dados indicam a necessidade de validação do algoritmo CNN em populações com condições clínicas específicas, bem como sugere o uso de outros métodos complementares para avaliar a densidade mamária nas pacientes com SG.

Descritores: Síndrome de Gilbert; Estrogênios/metabolismo; Neoplasias da mama; Densidade da mama.

ABSTRACT

Maesaka JY. *Breast density assessment using artificial intelligence by convolutional neural network in postmenopausal women with Gilbert's syndrome* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Gilbert's syndrome (GS) is described as an indirect hyperbilirubinemia that occurs in the absence of liver disease or hemolytic conditions. Its main clinical manifestation is episodes of intermittent jaundice. The increase in serum bilirubin levels in patients with GS is due to a reduction to about 30% of normal in the hepatic activity of the enzyme bilirubin-glucuronyltransferase. Changes in the glucuronidation pathway may justify changes in estrogen metabolism and possible repercussions of this exposure on the breast. We sought to assess the breast density of postmenopausal women using a mammography and Convolutional Neural Network (CNN) in this specific population, with the aim of identifying new tools for the follow-up of patients with this syndrome. **OBJECTIVES:** To evaluate breast density using artificial intelligence through a convolutional neural network in postmenopausal women with Gilbert's Syndrome. **METHODS:** Evaluation of 52 patients divided into three groups: Gilbert's Syndrome group consisting of 12 patients, a genotyped control group consisting of 9 patients, and a non-genotyped control group consisting of 31 patients. All underwent mammography and analysis by artificial intelligence using CNN. **RESULTS:** In the group of SG patients with dense breasts (extremely dense and heterogeneously dense), CNN had a sensitivity of 57.14%, specificity of 100%, with 75% accuracy, compared to sensitivity and specificity of 100% in the genotyped control group, and sensitivity of 44.44% and specificity of 92.31% in the non-genotyped Control group. The *kappa* coefficient of agreement of the breast densities assessed by radiologists and by CNN was 0.381 for the Gilbert Syndrome group, 0.700 for the genotyped control group and 0.291 for the non-genotyped control group. **CONCLUSION:** The sensitivity of CNN in identifying dense breasts in the SG group was lower than the genotyped control group and more similar to the non-genotyped control group. When compared to the assessment of breast density by the radiologist, CNN has substantial agreement in the genotyped Control group, but fair agreement in patients with GS. The data indicate the need for validation of the algorithm CNN in populations with specific clinical conditions, and to consider the use of other complementary methods to assess breast density in patients with GS.

Descriptors: Gilbert's syndrome; Estrogens/metabolism; Breast neoplasms; Breast density.



Introdução

1 Introdução

1.1 Síndrome de Gilbert

A Síndrome de Gilbert (SG) é descrita como uma hiperbilirrubinemia indireta que ocorre na ausência de doenças hepáticas ou quadros hemolíticos. A principal manifestação clínica dessa Síndrome são episódios de icterícia intermitente¹. Sua primeira descrição ocorreu em 1901, por Gilbert e Lereboullette, como condição relacionada à icterícia não associada a hemólise².

Em 1939, Meulengracht descreveu 24 casos de icterícia crônica intermitente, muito leve, dando a ela o nome icterícia intermitente juvenil. “A icterícia era sempre muito leve, fazia-se sentir apenas por um leve amarelecimento das escleras ou por um leve brilho amarelado da pele. (...) A icterícia prolongou-se ao longo de décadas, flutuou em intensidade e tornou-se mais pronunciada em doenças intercorrentes. O único sintoma subjetivo foi a fadiga nos períodos mais ictericos”³.

Dameshek e colaboradores, no ano de 1941, reportou duas famílias com o quadro de icterícia não hemolítica familiar. Informou “que eram mais ictericas do que doentes”, referindo-se a aparente benignidade e não progressão do quadro⁴. Ao mesmo tempo, apontavam para uma “disfunção hepática constitucional”, em citação aos estudos publicados em 1935 por Rozendaal e colaboradores que, em avaliação de 214 casos de icterícia, identificavam dois grupos distintos: um relacionado a hemólise; e outro no qual os sinais de hemólise estavam ausentes⁵. “Especialmente interessante é o chamado *icterus*

nervoso que ocorre neste tipo de disfunção hepática. Tivemos como pacientes um médico que ficou amarelo depois de um dia intenso, uma dona de casa cuja icterícia crônica aumentou quando ela ficou brava, e uma mulher cuja icterícia começou após um susto; todos esses casos podem representar exemplos de disfunção hepática devido a emoção.”

Em 1946, Alwall realizou análise crítica da literatura, em estudo com 15 pacientes, que se apresentavam ignorando sua bilirrubinemia, e “sintomas característicos: fraqueza, nervosismo, dispepsia”. Por associação a alta frequência de apresentação familiar, sugeriu a designação de bilirrubinemia não hemolítica hereditária. Considerando tratar-se de afecção de etiologia hepática, sua metabolização poderia resultar em modificação de sua atuação sistêmica⁶.

1.2 Diagnóstico clínico da Síndrome de Gilbert

A suspeita clínica para Síndrome de Gilbert ocorre em pacientes que apresentem períodos de icterícia sem etiologia definida. Essa icterícia também se apresenta de maneira intermitente; ou seja, tendem a desaparecer espontaneamente. Além disso, o achado de aumento nos níveis de bilirrubina não conjugada também sugere se tratar de paciente com a condição. O diagnóstico clínico da SG é, atualmente, feito por exclusão, como disposto no Quadro 1⁷:

Quadro 1 – Critérios diagnósticos da Síndrome de Gilbert

- Hiperbilirrubinemia não conjugada (17 – 102 $\mu\text{mol/L}$, 1 – 6 mg/dL), em geral exacerbada por jejum prolongado, cirurgia, infecção, esforço físico extenuante e ingestão de álcool

- Ausência de evidência de hemólise

- Resultados normais de testes de enzimas hepáticas

- Ausência de outra patologia associada com hiperbilirrubinemia não conjugada

FONTE: Hirschfield BM et al. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2006

O diagnóstico de icterícia intermitente pode ser laboratorialmente comprovado através de aumento de 90% nos níveis de bilirrubina não conjugada quando exposta a 48hs de dieta de restrição calórica⁸.

1.3 Bases moleculares e genéticas da Síndrome de Gilbert

O aumento dos níveis séricos de bilirrubina em pacientes com Síndrome de Gilbert ocorre devido a redução da atividade hepática da enzima bilirrubina-glucuroniltransferase a 30% do normal. O primeiro relato de identificação laboratorial (*in vitro*) deste mecanismo com função reduzida foi estabelecido por Arias et al. em 1957⁹, e posteriormente corroborados por Black et al. em 1969¹⁰. Esta atividade reduzida, resulta em uma menor porcentagem de bilirrubina diglucuronidase na bile desses pacientes.

A base genética da redução da atividade de glicuronidação da bilirrubina hepática em pacientes portadores da síndrome de Gilbert foi revelada em 1995,

por Bosma et al.¹¹ “Normalmente, um elemento A(TA)₆TAA está presente entre os nucleotídeos -23 e -38. Nos pacientes com diagnóstico de síndrome de Gilbert, os pacientes eram homozigotos para um elemento TA adicional, resultando na sequência A(TA)₇TAA.” Posto que o elemento TATAA é sítio de ligação para fatores de transcrição TFIID - que é considerado passo fundamental na transcrição das células eucarióticas - sua mutação pode resultar em redução da frequência e acurácia da iniciação transcricional. A presença desta inserção (UGT1A1 * 28) reduz a transcrição do gene a 20% do normal, resultando na redução de 80% na atividade de glicuronidação hepática da bilirrubina, nos indivíduos homozigotos¹².

Finalmente, Hsieh et al., através de um ensaio de deslocamento da mobilidade eletroforética competitivo (*electrophoretic mobility shift assay - EMSA*) demonstrou em laboratório que a inserção TA na sequência TATA-box de UGT1A1 afeta a afinidade de ligação da proteína de ligação TATA (*TATA-binding protein – TBP*), esclarecendo a patogênese da síndrome de Gilbert¹³.

Estudos populacionais indicam frequência entre 30% a 45% do alelo UGT1A1*28 em caucasianos; baseado nestes dados, 11-16% destes serão homozigotos (7/7) para a mutação¹⁴. Ainda, a síndrome de Gilbert pode ter apresentação genotípica distinta em diferentes populações^{15,16}, através de outras mutações como a G71R e a Y486D, identificada em populações asiáticas^{17,18}. Uma teoria que tenta justificar a heterogeneidade de distribuição em diferentes populações relaciona os locais com menor e maior prevalência da homozigose (ilhas do Pacífico e África, respectivamente) e o percurso migratório dos primeiros *Homo sapiens* pelo mundo.

Os possíveis genótipos associados a síndrome de Gilbert estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Genótipos associados à síndrome de Gilbert

	Mutação de Proteína	Mutação de DNA	Identificação de Mutação
Alelo 1		(TA) ₇ TAA	UGT1A1*28
Alelo 2		(TA) ₇ TAA	UGT1A1*28
Alelo 1	G71R	(TA) ₇ TAA	UGT1A1*28
Alelo 2		211G>A	UGT1A1*27
Alelo 1		(TA) ₇ TAA	UGT1A1*28
Alelo 2	Y486D	1456T>G	
Alelo 1	G71R	211G>A	UGT1A1*27
Alelo 2	G71R	211G>A	UGT1A1*27
Alelo 1	Y486D	1456T>G	
Alelo 2	Y486D	1456T>G	
Alelo 1	G71R	211G>A	
Alelo 2	Y486D	1456T>G	
Alelo 1		(TA) ₇ TAA mutação estrutural	UGT1A1*28
Alelo 2			
Alelo 1	G71R	211>A mutação estrutural	UGT1A1*28
Alelo 2			
Alelo 1	Y486D	1456T>G mutação estrutural	
Alelo 2			

FONTE: Bosma PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. J Hepatol. 2003;38(1):107-17.

Por se tratar da mutação mais estudada mundialmente e também no Brasil, a atenção do estudo em questão foi focada para a UGT1A1*28. Apesar da SG ser considerada uma doença de curso benigno, não necessitando de nenhum tratamento, pacientes portadores dessa síndrome podem ser mais susceptíveis aos efeitos adversos de algumas medicações metabolizadas pela enzima UGT1A1¹⁹, sendo importante realizar o diagnóstico desses pacientes¹².

A pesquisa genética de alguns polimorfismos pode fornecer um diagnóstico mais preciso¹². Inicialmente, é feita a pesquisa para a mutação UGT1A1*28 através do método de sequenciamento ou reação em cadeia da

polimerase (PCR) em tempo real. Se o paciente portador de SG for homozigoto para a mutação, não é necessário rastrear outras alterações. No entanto, se apenas um alelo contém a mutação UGT1A1*28, ou quando as caixas TATA de ambos os alelos são normais, pode-se, subseqüentemente, rastrear a presença da mutação G71R e a Y486D, que também têm sido relatadas em pacientes com SG.

1.4 Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres e a segunda principal causa de mortes relacionadas ao câncer em mulheres em todo o mundo, depois do câncer de pulmão. Dados do GLOBOCAN (projeto da International Association Cancer Registers, IARC) estimam 2,1 milhões de casos novos de câncer de mama diagnosticados no mundo e mortalidade estimada de 680mil mulheres no ano de 2020²⁰. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que serão diagnosticados 66.280 novos casos no ano de 2021²¹.

Os tumores malignos de mama são classificados segundo o padrão de diferenciação histológica refletindo diferentes tipos celulares. Os carcinomas são os mais frequentes, enquanto as neoplasias com diferenciação mesenquimal são raras²².

Atualmente, são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama história familiar de câncer de mama ou ovário²³, presença de mutações em genes como *BRCA1* e *BRCA2*²⁴, uso de terapia de reposição hormonal²⁵, obesidade na mulher pós menopausa²⁶, e consumo de álcool²⁷.

Também é conhecido o aumento de risco por exposição à radioterapia torácica²⁸ e características como a densidade mamária^{29,30}, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Fatores de risco hormônio-relacionados para câncer de mama

Indicador	Baixo risco	Alto risco	Risco relativo
sexo	masculino	feminino	150
Idade (anos)	30-34	70-74	17
Idade da menarca (anos)	>14	>12	1,5
Uso de contraceptivo oral	nunca	Prévio ou vigente	1,07 - 1,2
Idade no 1º parto (anos)	<20	≥30	1,9 - 3,5
Amamentação (meses)	≥16	0	1,37
paridade	≥5	0	1,4
Ooforectomia (idade em anos)	<35	>35	3,0
Menopausa natural (idade em anos)	<45	≥55	2,0
Terapia estrogênica	nunca	vigente	1,2 - 1,4
Terapia estrógeno-progestagênica	nunca	vigente	1,4
IMC* pós-menopausa	<22,9	>30,7	1,6
Historia familiar de câncer de mama	ausente	presente	2,6
Concentração sérica de estradiol	Quartil inferior	Quartil superior	1,8 - 5,0
Densidade mamária na mamografia (%)	0	≥75	6,0
Densidade óssea	Quartil inferior	Quartil superior	2,7 - 3,5

FONTE: Clemons M et al. N Engl J Med. 2001 Jan 25;344(4):276-85.

NOTA: IMC: índice de massa corpórea

É consenso que o tamanho do tumor e as condições dos linfonodos regionais são fatores relevantes nas mulheres com câncer de mama, possuindo valor prognóstico e impactando diretamente no tratamento. Além disso, outros critérios prognósticos são utilizados, como expressão de receptores de estrogênio e progesterona, superexpressão de HER2, grau nuclear e assinatura molecular³¹. A maioria dos cânceres de mama são descobertos através de uma mamografia, durante o exame físico de rotina ou como uma massa identificada

pelo próprio paciente. Menos comumente, a apresentação do caso é mais sintomática, cursando com a dor, aumento de volume, espessamento ou retração da pele na região da mama.

Por se tratar de doença heterogênea do ponto de vista de apresentação clínica e morfológica e diferentes respostas aos tratamentos, Perou et al.³² identificaram, através da identificação de padrões gênicos em um banco de tumores, diferentes subtipos moleculares: luminal A, luminal B, HER2 superexpresso e triplo negativo³³. Estes subtipos moleculares são capazes de identificar o prognóstico dos pacientes³⁴, bem como predizer o benefício no emprego das diferentes formas de tratamento adjuvantes³⁵. Como característica os tumores luminais expressam receptores hormonais, estrogênio e progesterona, relacionados a características referentes ao processo de carcinogênese³⁶, de proliferação celular³⁷, e de alvos terapêuticos³⁸. Assim sendo, relaciona-se o acúmulo de estrogênio e seus metabólitos à carcinogênese mamária, como será exposto a seguir.

O rastreamento do câncer é baseado no uso sistemático de exames ou testes clínicos em mulheres assintomáticas com a finalidade de identificar pacientes na fase pré-clínica da doença³⁹. O tratamento é determinado pelas características do tumor, estadiamento, condições e desejos individuais de cada paciente, e pode incluir cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapias-alvo e terapia endócrina⁴⁰.

1.5 Papel do estrogênio e seus metabólitos na gênese do câncer de mama

É amplamente aceito que a exposição prolongada aos estrogênios e seus metabólitos oxidativos desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer de mama^{22,30}. As primeiras correlações vieram dos relatos de Beatson em 1896, em pacientes com câncer de mama inoperável que apresentaram melhora clínica após remoção de ovários⁴¹.

No ano de 1897, Boyd publica sua série de 5 casos de pacientes tratadas para o câncer de mama através de ooforectomia. “Minha hipótese de trabalho é de que a secreção interna dos ovários favorece, em alguns casos, o crescimento do câncer”⁴².

Dados epidemiológicos descrevem associações entre níveis de estrogênio séricos e risco de câncer de mama em pacientes na pós-menopausa^{22,43,44}. Os dados referentes a mulheres na menacme são mais escassos, em parte pela complexidade de medir níveis hormonais que variam de maneira cíclica⁴⁵.

Do ponto de vista clínico, condições relacionadas a exposição ao estrogênio como menarca precoce, menopausa tardia e uso de terapia de reposição hormonal estão associados ao aumento de risco ao câncer de mama, assim como a menopausa precoce atua como fator protetor^{30,46}. Tais informações são empregadas na prática diária através de modelos de predição de risco para câncer de mama, como o modelo de Gail et al.⁴⁷. Através de um questionário avalia-se o risco durante a vida da paciente desenvolver câncer de mama. O questionário está disposto na Tabela 3.

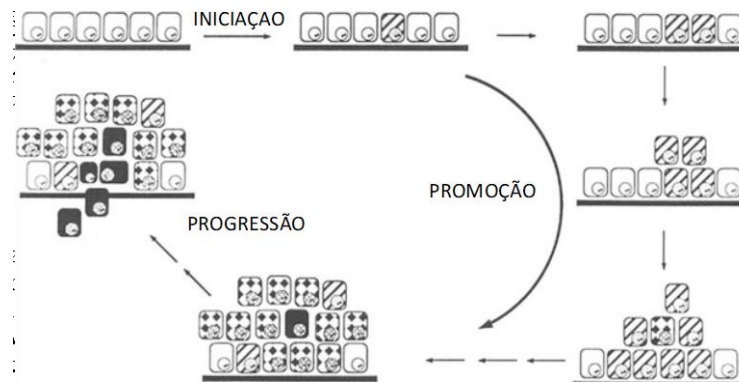
Tabela 3 – Questionário para aplicação do modelo de Gail

Idade (em anos)	35 a 85
primeira menstruação (idade em anos)	ignorado 7-11 anos 12-13 anos ≥14 anos
Primeiro parto – feto vivo (idade em anos)	ignorado Sem partos <20 anos 20-24 anos 25-29 anos ≥30 anos
Parentes de primeiro grau com câncer de mama	ignorado 0 1 >1
Biópsia mamária prévia	ignorado 0 1 >1
Raça / etnia	Branco Afro-americano Hispânico / latino Asiático-americano Indígena ou nativo do alaska ignorado

FONTE: Gail MH et al. JNCI. 1989;81(24):1879-86.

O desenvolvimento de tumor maligno de linhagem epitelial é chamado de carcinogênese. Por se tratar de processo em múltiplas etapas, é dividido em três fases: iniciação; promoção; e progressão⁴⁸ (Figura 1). A iniciação é caracterizada pela ação dos agentes carcinógenos, levando ao aparecimento de uma única célula alterada no tecido normal. A promoção está associada a capacidade de proliferação desta célula alterada, levando a uma expansão clonal desta população celular, resultando no surgimento de variantes de maior autonomia que seletivamente superam seus progenitores e dão origem à linhagem de células neoplásicas. A progressão da neoplasia para malignidade é

caracterizada pelo surgimento de células com capacidade de invasão e metástase.



FONTE: Drinkwater NR et al. Manual of Clinical Oncology, 1990.

Figura 1 – Modelo evolutivo de carcinogênese

O efeito cancerígeno dos estrogênios se manifesta através da capacidade de metabólitos do estrogênio intermediários em formar radicais superóxido e outros radicais livres que danificam o ácido desoxirribonucleico (DNA)⁴⁹, além da atuação direta da estimulação e inibição das vias de sinalização do receptor de estrogênio, associados a proliferação e apoptose³⁸. As variações que ocorrem no tecido mamário relacionadas a produção e metabolização do estrogênio podem atuar nos mecanismos de iniciação e gênese do câncer de mama.

1.6 Papel da UGT1A1 na carcinogênese da mama

Alta concentração sérica de estrógenos tem ações proliferativas descritas em tecidos da mama, endométrio e osso; no entanto, esta é geralmente associada com a maturação do tecido, não com a perda de diferenciação. Além

das evidências epidemiológicas de que estrogênios estão fortemente relacionados com o aparecimento dos nódulos mamários, há dados laboratoriais que mostram que as culturas de células ao receber grandes quantidades de estrogênios acumulam danos no DNA, resultando em morte celular e carcinogênese⁵⁰.

A Enzima UGT1A1, que apresenta atividade reduzida a 80% em portadores da SG, também participa do metabolismo do 4-OH-estrogênio. Esse hormônio só é eliminado quando está conjugado com o sulfato, glucuronosil e glutathione. Essa conjugação ocorre através de reações catalisadas por enzimas das famílias dos sulfotransferases (SULT), glucuronosiltransferase (UGTs) e glutathione Transferases (GST), respectivamente^{30,51}. As UGTs catalisam reações de glucuronidação, importantes vias de metabolização de drogas e outros ativos, participando da detoxificação de diferentes moléculas, dentre as quais carcinógenos e esteroides sexuais⁵². Além disso, enzimas UGT atuam para manter níveis intracelulares de esteroides na homeostase de tecidos estrogênio-alvos⁵³. Em teoria, os pacientes com SG poderiam ter um risco aumentado para desenvolver câncer de mama devido a um acúmulo de 4-OH-estrogênios^{49,54}. Mudanças na via de glucuronidação podem justificar alterações no metabolismo de estrogênio.

1.7 Histórico da mamografia – invenção, desenvolvimento, importância clínica

A mamografia faz uso de feixe de radiação específico, em aparelho dedicado para sua realização. Por meio da estimulação de elétrons, ocorre

estimulação em receptor (em geral revestido por tungstênio), o qual é responsável pela emissão de energia na forma de radiação. Tal energia é submetida a filtro, o qual seleciona a apresentação ideal de energia através da exclusão de formas periféricas de baixa e alta potências, e perpetuação da forma ideal para aquisição das imagens. A mama, então adequadamente comprimida, recebe o feixe de radiação. Ainda que desconfortável, a compressão tem seu papel pois reduz a espessura de tecido, diminuindo o efeito de radiação espalhada – responsável por borramento da imagem adquirida⁵⁵.

Convencionalmente, o estudo mamográfico se dá por meio de análise em duas projeções. Utiliza-se a incidência médio-lateral oblíqua (MLO) acrescida da incidência crânio-caudal (CC) as quais, em conjunto, possibilitam visualização abrangente do tecido mamário. É por meio da interação entre o tecido mamário comprimido e o feixe de radiação adequadamente trabalhado que resulta imagem bidimensional de qualidade, onde se distinguem diferentes texturas da glândula mamária, as quais viabilizam a identificação de alterações texturais da mama.

Durante a aquisição das imagens, distinguem-se as mamografias ditas convencionais e as digitais. Na mamografia convencional, após a energia ultrapassar o tecido mamário, ela é captada pelo chassi associado a um filme radiográfico. Este recebe a radiação então convertida em luz e, quando refletida, gera a imagem que ficará documentada no filme, tornando este filme então responsável pela detecção dos raios-X, seguido de armazenamento e reprodução da imagem⁵⁶.

O mamógrafo digital, incorporado como evolução tecnológica, substitui o uso do filme por detectores os quais transformam a radiação em sinais elétricos que serão convertidos em imagens. Em mamógrafos digitais com detectores diretos, o fotocondutor realiza a absorção dos raios X e conversão direta para sinais digitais. No caso de detectores indiretos, ocorre a captura da radiação por um cintilógrafo, com conversão à fótons de luz, e posterior conversão para sinais digitais lidos através de um sistema de transistores. Nota-se, do ponto de vista clínico, aparente ganho em eficácia quando da utilização dos mamógrafos digitais frente aos convencionais no rastreamento do câncer de mama, principalmente no contexto de pacientes jovens com mamas densas, apresentando sensibilidade e especificidade de 41% e 98%, respectivamente⁵⁷.

Do ponto de vista clínico, atribui-se à adoção da mamografia como método de rastreamento o marco da prevenção secundária do câncer de mama. Com a evolução das técnicas empregadas houve redução da exposição dos pacientes à radiação e seus possíveis efeitos deletérios⁵⁵. Junto ao aumento de sua distribuição global e nacional, tornou-se progressivamente mais acessível, e atualmente faz parte do programa nacional de rastreamento do Ministério da Saúde⁵⁸.

1.8 Densidade mamária

Durante a execução do exame de mamografia identifica-se a diferença de atenuação entre os tecidos gordurosos e o tecido fibroglandular mamário. Define-se como densidade mamária a proporção entre tecido fibroglandular e gorduroso avaliado em exame de mamografia⁵⁹. Aspectos relacionados à

densidade mamária historicamente foram interpretados como fatores que dificultam a identificação de lesões suspeitas, uma vez que mamas mais densas são mais radiopacas, resultando em uma imagem com tons mais brancos e, conseqüentemente, resultando em menor contraste com nódulos (os quais também são representados em tons brancos).

Em 1976 nos trabalhos de John N. Wolfe gerou-se a primeira correlação entre os aspectos do então chamado padrão de parênquima mamográfico e o risco de desenvolvimento de câncer de mama⁶⁰. Por meio da avaliação de 5284 pacientes cadastradas no banco de registros de Michigan (*Michigan Cancer Foundation Tumor Registry*), foram elaborados quatro classificadores de padrão de parênquima, dispostos no Quadro 2.

Quadro 2 – Padrões de parênquima mamário conforme Wolfe

- N1 – mama “normal”, composta predominantemente por gordura
- P1 – predominantemente gordurosa, porém com pequena quantidade de ductos proeminentes
- P2 – maior quantidade de ductos proeminentes, identificado em mais da metade do parênquima mamário
- DY – Caracteriza um aumento global na densidade do parênquima mamário, podendo ser ou não homogêneo

FONTE: Wolfe JN. *Cancer*. 1976;37(5):2486-92.

Com o uso de tais classificadores, no seguimento médio de 2,5 anos relaciona-se a incidência de câncer de mama e o classificador de risco descrito pelo autor (Tabela 4). Futuramente, Wolfe descreveria um quinto classificador, associado então ao padrão encontrado em pacientes jovens⁶¹.

Tabela 4 - Classificação de risco de acordo com o padrão de parênquima, descrito por Wolfe

Classificador	Incidência de câncer de mama	risco
N1	0,1	Mínimo
P1	0,4	Moderado
P2	1,7	Significante
DY	2,2	Maior

FONTE: Wolfe JN. Cancer. 1976 May;37(5):2486-92.

Em 1995, Boyd e colaboradores apresentaram estudo buscando a utilização de classificadores quantitativos para a densidade mamária. Fazendo uso da interpretação realizada por radiologistas treinados e métodos assistidos por computador, avaliaram 708 pacientes obtidos do banco de dados do estudo canadense de rastreamento para câncer de mama (*Canadian National Breast Cancer Screening Study*). De acordo com a proporção percentual de mama ocupada pelas densidades, estabeleceu-se classificador relacionado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama. Os resultados estão dispostos na Tabela 5. A correlação de classificação entre radiologistas e assistida pelo computador foi semelhante⁵⁹.

Tabela 5 - Risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama de acordo com a densidade mamográfica utilizando classificação de Boyd e colaboradores

Proporção de densidade mamográfica	Risco Relativo
Nenhuma	1,0
<10%	1,2
10 – 25%	2,2
25 – 50%	2,4
50 – 75%	3,4
>75%	5,3

FONTE: modificado de Boyd NF. J Natl Cancer Inst. 1995 May 3;87(9):670-5.

Cabe atentar um aspecto identificado no trabalho, gerando relação direta entre a proporção de densidade mamária e o aumento do risco relativo, sendo que a cada progressão de categoria resultava em incremento de 43% e 32% no risco relativo na avaliação feita pelo radiologista e assistida por computador, respectivamente.

Em 1997, Gram e colaboradores publicam a classificação de Tabár, baseada em correlações anatomo-mamográficas e que divide o padrão de parênquima mamográfico em 5 padrões distintos⁶². Utilizando as informações de base de dados de 3640 pacientes da Noruega, a publicação faz uma comparação direta com a classificação de Wolfe e, conforme exposto no Quadro 3, compreende os padrões de parênquima em 5 categorias assim dispostas:

Quadro 3 – Classificação de Tabár dos padrões de parênquima mamário

- Padrão I	contornos lobulados, com opacidades ovaladas e densidades nodulares de 1-2mm distribuídas pelo parênquima
- Padrão II	Predominantemente lipossustituida
- Padrão III	Predominantemente lipossustituida com ducto proeminente, relacionado a elastose
- Padrão IV	Densidades lineares e nodulares características, sendo as densidades nodulares maiores que os lóbulos normais
- Padrão V	Padrão em vidro fosco homogêneo, associado a fibrose pouco estruturada, determinando contorno convexo

FONTE: Gram IT et al. European J Radiol, 1997.

O aumento do risco para câncer de mama foi associado aos padrões IV e V, os quais seriam similares aos padrões P2 e DY da classificação de Wolfe.

No contexto de maior adoção do uso de mamografias, por vezes utilizando técnicas distintas, e a aparente dificuldade em estabelecer nomenclaturas de uso comum, o Colégio Americano de Radiologia (*American College of Radiology, ACR*) em 1980 tomou a iniciativa de criar um comitê de acreditação. Reunindo entidades médicas como *Food and Drug Administration (FDA)*, Associação Médica Americana, Instituto Nacional do Câncer, Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Sociedade Americana do Câncer, Colégio Americano de Patologistas, entendendo a necessidade de padronização na terminologia como fato importante para avaliação da qualidade de um laudo mamográfico. Assim foi elaborado o primeiro BI-RADS® (*Breast Imaging Reporting and Data System®*), publicado em 1986. Nele, incluía-se a densidade mamária como parte do laudo a ser descrito pelo médico radiologista. Sendo submetido a

aprimoramentos continuados, sua quinta edição estabelece nomenclatura para descrição da composição mamária, ilustrado no Quadro 4⁶³:

Quadro 4 – Classificação da densidade mamária pelo BI-RADS®

- | | |
|-----|--|
| - A | As mamas são predominantemente lipossubstituídas |
| - B | Densidades fibroglandulares esparsas |
| - C | Mamas heterogeneamente densas, o que podem obscurecer pequenos nódulos |
| - D | Mamas extremamente densas, o que reduz a sensibilidade da mamografia |

FONTE: ACR BI-RADS® 5ª. Edição, 2013.

A quinta edição do léxico atualizou as definições de composição mamária estabelecidas pela quarta edição, as quais definiam os padrões através de percentual de composição por tecidos mais densos, entendidos então como mais quantitativos que a atual edição. Atualmente, o BI-RADS é o método de avaliação da densidade mamária mais frequentemente utilizado por radiologistas e, no Brasil, tem recomendação de incorporação do seu uso, sendo aplicado na capacitação dos radiologistas em formação e nos exames mamográficos realizados, tendo inclusive publicação do atlas pelo Colégio Brasileiro de Radiologia traduzido para o português⁶⁴.

Em 1994, estudo realizado na Universidade de Toronto por Byng e colaboradores incorporou a assistência realizada por computador em uma análise quantitativa da densidade mamária⁶⁵. As imagens em filme eram

inicialmente digitalizadas e direcionadas a um software para processamento e visualização. Na sequência, observadores estabeleciam limites de tons de cinza relacionados ao padrão de mama densa de cada imagem. O programa então quantificava a proporção entre mama densa e tecido lipossustituído, apresentando boa correlação dos resultados com a interpretação por radiologistas. Chamado de Cumulus®, o programa foi considerado por muitos anos o padrão ouro para medida quantitativa de densidade mamária. Ainda assim, identificava-se como limitação do método a necessidade de interpretação humana, a qual poderia interferir em sua reprodutibilidade. Baseados nestas prerrogativas, diferentes grupos buscaram desenvolver metodologias completamente automatizadas^{66,67}. Em paralelo, novas tecnologias são incorporadas para agregar informações relacionadas à espessura, trazendo uma abordagem tridimensional ao conceito antes definido apenas pela área de distribuição. Ganha destaque a plataforma Volpara®, a qual correlaciona de maneira bastante satisfatória as informações de densidade mamária e de volume de mama densa, trazendo à discussão dados como espessura mamária⁶⁸, obtendo coeficiente de correlação de densidade mamária de 0.93.

1.9 Redes neurais

De acordo com Haykin, rede neural, também denominada rede neural artificial, constitui “um processador paralelamente distribuído, constituído por unidades de processamento simples, que tem a propensão natural para armazenar conhecimento experimental e torná-lo disponível para uso”⁶⁹. Possui

este nome por conta de sua unidade de processamento fundamental se assemelhar ao neurônio.

Estudos de McCulloch e Pitts em 1943 elaboraram um modelo matemático que procurava se assemelhar ao conceito de neurônio biológico (unidade de processamento). Neste, diferentes entradas seriam vinculadas a diferentes pesos e, caso ultrapassassem um limiar pré-definido, geraria uma resposta ao estímulo. Trata-se então de uma somatória de variáveis vinculadas a pesos específicos, resultando em uma única resposta⁷⁰. Em um contexto de múltiplas camadas destes neurônios formam-se as redes neurais, constituídas de camadas de entrada, camadas intermediárias e camadas de saída, sendo que cada neurônio estabelece suas conexões e estabelece pesos a serem determinados de acordo com seu padrão de ativação.

Essas redes possuem como características fundamentais serem dinâmicas e auto-adaptativas⁷¹. Dinâmicas por se utilizarem de suas experiências para se modificar e apresentar melhores respostas a cada estímulo. Adaptativas porque seus elementos de processamento possuem capacidade de ajuste, atingida através de três aspectos fundamentais:

Aprendizado – as conexões realizadas e suas entradas são ajustados cada estímulo, objetivando respostas cada vez mais satisfatórias a uma determinada entrada. Esse aprendizado pode ser supervisionado (no qual parâmetros de entrada e saída são avaliados); ou não supervisionado (onde apenas parâmetros de entrada são interpretados).

Treinamento – é o modo pelo qual o sistema aprende a respeito da informação a ser tratada. Isso leva em consideração aspectos similares aos

neurônios biológicos, nos quais conexões altamente ativadas possuem reforços em suas ligações. Assim, estabelecem-se diferentes pesos para cada conexão e para cada tipo de entrada.

Generalização – trata-se da capacidade da rede de responder de maneira adequada a estímulos que não faziam parte do seu conjunto de treinamento. A capacidade de generalizar é importante pois possibilita ao sistema oferecer soluções mesmo diante de inserções incompletas ou imprecisas. Para tanto, utilizam-se dados de validação distintos dos dados de treinamento. Neste sentido, dimensionar adequadamente sua rede buscando torná-la simples aumenta sua capacidade de generalização. Redes ditas complexas possuem generalização pobre. O desafio é encontrar a menor rede possível que acomode os dados a serem inseridos.

Já a convolução é a operação matemática realizada entre dois sinais, resultando num terceiro sinal, sendo parte fundamental da interpretação de imagens realizada por inteligência artificial (IA). Uma linha de programação realiza análise das imagens em pixels e, por meio do uso de filtros, é capaz de identificar padrões que resultem em capacidade de discriminar diferentes tipos de imagens.

Baseado nos dados hoje existentes na literatura, nosso estudo tem o propósito de avaliar, em pacientes com Síndrome de Gilbert as repercussões relacionadas à metabolização hepática do estrogênio na mama, em especial a densidade mamária. A melhor compreensão da aplicabilidade do uso de IA por meio das redes neurais convolucionais pode trazer subsídios para a

incorporação de novas tecnologias de interpretação de exames de imagem, com a finalidade de melhorar a interpretação e reduzir os custos.



Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliação da densidade mamária com o uso de inteligência artificial por rede neural convolucional em mulheres na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança do método;
- Avaliar o valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia da rede neural convolucional;
- Correlacionar a rede neural convolucional com o padrão mamográfico e com o padrão *histogram*;
- Relacionar os resultados da rede neural convolucional e da mamografia com as características demográficas (idade, etnia, paridade, amamentação, comorbidades, antecedentes familiares) e clínicas (IMC, índice de Gail, níveis séricos de bilirrubina total e não-conjugada) das pacientes.



Casuística e Métodos

3 Casuística e Métodos

3.1 Aspectos Éticos

O presente estudo está em conformidade com a regulamentação internacional de bioética, e foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP (Anexo A) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPEsq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número de parecer 16291 (Anexo B). Uma emenda foi realizada sequencialmente, a qual também foi aprovada pela mesma CAPPEsq (Anexo C).

3.2 Desenho do estudo

Estudo piloto prospectivo.

3.3 Sujeitos

As pacientes foram selecionadas nos seguintes setores:

- Pacientes do sexo feminino genotipadas para os polimorfismos da região promotora do gene UGT1A1 no Ambulatório de Hepatites Virais da Divisão de Gastroenterologia e Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

- Pacientes do Setor de Climatério da Divisão de Ginecologia do HCFMUSP.

O recrutamento de pacientes ocorreu entre setembro de 2018 a setembro de 2021. Doze pacientes previamente genotipadas, portadoras do polimorfismo TA7/7 (UGT1A1*28), TA7/8 ou TA8/8, com diagnóstico comprovado de Síndrome de Gilbert, constituíram o grupo Síndrome de Gilbert (SG). 9 pacientes com genotipagem TA6/6 (UGT1A1*28) compuseram o Grupo Controle Genotipado (CG). 31 pacientes do Setor de Climatério formaram o Grupo Controle Não-Genotipado (CNG).

3.4 Critérios de inclusão e não-inclusão

Critérios de inclusão

- Idade entre 40 e 70 anos;
- Paciente na pós-menopausa;
- Assinatura do termo de consentimento.

Critérios de não-inclusão

- Pacientes portadoras do Vírus da imunodeficiência adquirida HIV;
- Pacientes cirróticas;
- Recusa na participação do estudo.

3.5 Método de estudo

As pacientes foram convocadas para entrevista no Ambulatório Breve do Setor de Mastologia da Divisão de Ginecologia do HCFMUSP. Nesse encontro, após esclarecimentos à participante, foi assinado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexos D e E). A entrevista coletou características individuais, antecedentes pessoais de saúde, antecedentes familiares, fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama e sintomas clínicos. Mamografia bilateral foi solicitada a todas as participantes. Mediante as características obtidas na entrevista, as pacientes portadoras foram pareadas às não-portadoras da Síndrome de Gilbert.

Os dados demográficos e clínicos das pacientes também foram coletados pelo pesquisador por meio de consulta aos prontuários eletrônicos da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, respeitando o sigilo das informações. Para a coleta dos dados foi utilizada a plataforma RedCAP⁷².

3.6 Sequenciamento da UGT1A1

Os sequenciamentos dos fragmentos de PCR foram feitos com o kit Big Dye Terminator Mix v3.2, utilizando o sequenciador automático ABI377 (Applied Biosystem, Foster City, EUA). A reação de sequenciamento foi feita no termociclador Mastercycler Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), utilizando 40 ng a 80 ng de fragmento de PCR purificado, 2,5 pmol de primer UGT1A1 Direto e Reverso, 6 µL de Tampão de sequenciamento, 4 µL de Big Dye terminator e água MilliQ estéril em quantidade suficiente para 20 µL. As reações de sequenciamento foram feitas nas seguintes condições: 25 ciclos (95°

C durante 20 segundos; 50° C durante 15 segundos; 60° C durante 1 minuto). Após o término dos ciclos, as reações foram precipitadas com 80 µl de isopropanol 95 % (v/v), incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e submetidas à centrifugação por 3.700 rpm por 60 minutos à temperatura ambiente na centrífuga Eppendorf modelo 5804R. O sobrenadante foi descartado por inversão, e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 75 % (v/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o precipitado seco a 55° C por aproximadamente 40 minutos no termociclador Mastercycler Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após a precipitação, as reações de sequenciamento secas foram ressuspensas em 3 µL de loading buffer (5:1-formamida/Dextran Blue) (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e levadas para o sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas e analisadas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor⁷³ e Codoncode (Codoncode Corporation). O programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), também, foi utilizado para pesquisa em banco de dados⁷⁴.

O sequenciamento de DNA foi realizado em 4h30. A análise do polimorfismo na região promotora do gene UGT1A1 foi realizada visualmente utilizando o programa Bioedit⁷³ e Codoncode (Codoncode Corporation), conforme os eletroferogramas obtidos: TA5/6, TA5/7, TA6/6, TA6/7, TA7/7, TA7/8 e TA8/8⁷⁵.

3.7 Avaliação dos marcadores imagenológicos da mama para exposição ao estrogênio

O aspecto radiológico das mamas depende da proporção de gordura, tecido conjuntivo e epitelial. A densidade mamária é a característica que classifica essa relação. É fato que pacientes com mamas mais densas possuem maior risco para câncer de mama²⁹. Acredita-se que a densidade mamária seja determinada pela exposição hormonal, baseado no fato de que mulheres com mamas densas possuem níveis séricos de estrogênio mais altos que mulheres com mamas menos densas, e que a terapia de reposição hormonal aumenta a densidade mamária⁷⁶.

Todas as participantes foram submetidas à mamografia digital em duas incidências (MLO e CC) em equipamento Lorad-Selenia / Hologic™. As imagens obtidas tiveram inicialmente sua densidade mamária classificada pela equipe de radiologistas do Instituto de Radiologia do HCFMUSP.

Na sequência, as imagens mamográficas foram extraídas em formato *.jpg*, convertidas para formato *.png*, com redimensionamento para 2000x2600 pixels, e as imagens MLO e CC do lado direito da paciente foram espelhadas na horizontal, para interpretação do algoritmo. A avaliação automatizada foi feita com base em um algoritmo de Rede Neural Convolucional (CNN) desenvolvido por Wu e colaboradores⁷⁷, treinado em uma extensa base de dados, e disponibilizado em banco de códigos público no endereço https://github.com/nyukat/breast_density_classifier. Após aplicação do código do algoritmo, obtém-se a classificação da densidade mamária por meio do histograma de intensidade de pixels da imagem (*Histogram*) e pela inteligência artificial CNN.

3.8 Análise Estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva que resultou em tabelas de frequência para variáveis qualitativas. Estatísticas descritivas incluindo média desvio padrão, mediana e intervalo interquartil (IIQ), (P25-P75) foram calculadas para resumir as variáveis quantitativas contínuas e discretas.

Para estudar a distribuição das variáveis qualitativas de acordo com o grupo foi empregado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer quando necessário. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a distribuição dos fatores de interesse entre os 3 grupos de investigação. O teste é uma extensão do teste de Mann-Whitney e utilizado para comparar três ou mais populações, o método estatístico testa a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes. Quando significativa as comparações múltiplas levaram em consideração o método de Bonferroni⁷⁸.

Os parâmetros diagnósticos avaliados foram sensibilidade, probabilidade de que o resultado do teste seja positivo quando a doença estiver presente (taxa positiva verdadeira), especificidade, probabilidade de que o resultado do teste seja negativo quando a doença não estiver presente (taxa negativa verdadeira), razão de verossimilhança positiva, expressa em quantas vezes o diagnóstico de uma doença se torna mais provável se o resultado do teste for positivo, ou seja, corresponde a taxa de probabilidade de um teste ser positivo na presença de doença sobre a probabilidade do teste ser positivo na ausência de doença;

Razão de verossimilhança negativa, expressa em quantas vezes o diagnóstico de uma doença se torna mais provável se o resultado do teste for negativo, ou seja, corresponde a taxa de probabilidade de um teste ser negativo na presença de doença sobre a probabilidade do teste ser negativo na ausência de doença; Valor preditivo positivo que é a proporção de resultados de testes positivos que são verdadeiros positivos e expressa a probabilidade condicional de um paciente com o teste positivo ter a doença; Valor preditivo negativo que se refere a proporção de resultados negativos que são verdadeiros negativos e expressa a probabilidade condicional de um paciente com o teste negativo não ter a doença; e a acurácia que é a probabilidade global de que um paciente seja classificado corretamente⁷⁹.

Os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo são expressos como porcentagens e seus intervalos de confiança são calculados pelo método exato de Clopper-Pearson. Os Intervalos de confiança para as razões de verossimilhança são calculados usando o método Log^{80,81}.

O coeficiente *kappa* foi utilizado para avaliar concordância entre dois métodos. Sugere-se os seguintes pontos de corte segundo referência: valores maiores que 0,75 representam excelente concordância, valores situados entre 0,40 e 0,75 representam concordância mediana e os valores abaixo de 0,40 representam baixa concordância⁸².

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0,05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares IBM SPSS 25 (*Statistical Package for the Social Sciences*) e Excel 2010® (Microsoft Office).



Resultados

4 Resultados

Foram incluídas no estudo 52 participantes, 12 (23,1%) no grupo Gilbert, 9 (17,3%) no grupo Controle genotipado e 31 (59,6%) do grupo Controle não genotipado. A média de idade das pacientes foi de 59,8 anos ($\pm 5,3$). Enquanto a paciente mais jovem tinha 50 anos de idade, a mais velha tinha 69. Quando avaliadas em relação à etnia, 71,1% das pacientes se autodeclararam brancas/caucasianas, e 7,6% negras e 23,0% pardas. Na Tabela 6 pode-se verificar a distribuição segundo os grupos.

Tabela 6 – Características sociodemográficas dos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado

	Gilbert	Controle genotipado	Controle não genotipado	<i>p</i> -valor
Idade <i>média</i> ($\pm DP$)	61 ($\pm 3,9$)	61 ($\pm 5,92$)	59,0($\pm 5,7$)	0,367
Raça <i>n</i> (%)				
<i>Caucasiano</i>	7 (58,3%)	3 (33,3%)	23 (74,2%)	0,045
<i>Negro</i>	1 (8,3%)	1 (11,1%)	2 (7,1%)	
<i>Pardo</i>	2 (16,7%)	5 (55,6%)	5 (16,1%)	
<i>Amarelo</i>	2 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (3,6%)	

NOTA: Valor de *p* baseado nos testes de Kruskal-Wallis e no teste exato de Fischer
DP: Desvio Padrão

A Tabela 7 demonstra os resultados da avaliação do índice de massa corpórea, comorbidades, antecedentes familiares de câncer de mama, tabagismo e etilismo nos diferentes grupos. O índice de massa corpórea médio das pacientes foi de 27,7, com o limite inferior de 19,6 e limite superior de 49,1.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,544$). Entre as comorbidades estudadas, a hepatite C mostrou-se heterogênea, com 5 (41,7%) no grupo Gilbert, 1 (11,1%) no grupo controle e nenhuma no controle climatérico ($p=0,001$), fato que pode estar relacionado à forma de recrutamento das pacientes genotipadas, que foram recrutadas no Ambulatório de Hepatites Virais, onde são acompanhadas pacientes portadoras do vírus HCV.

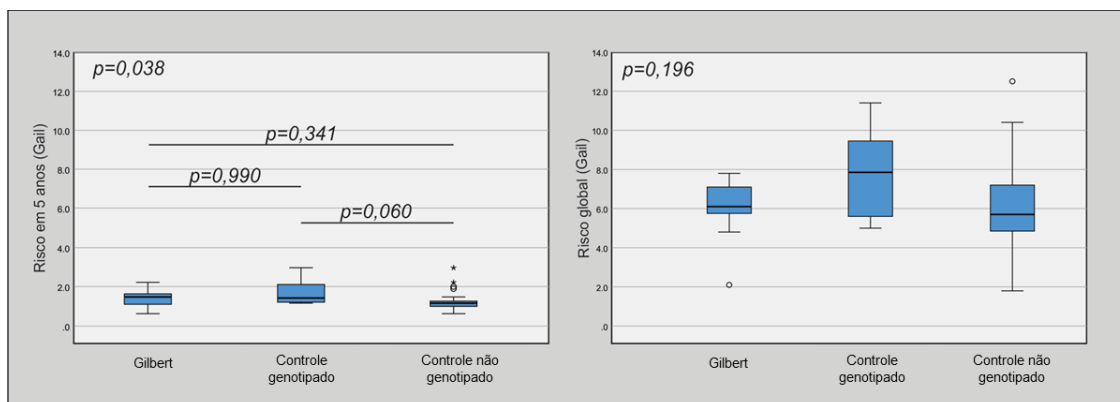
Tabela 7 – Índice de massa corpórea, antecedentes pessoais, antecedentes familiares e tabagismo nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado

	Gilbert	Controle genotipado	Controle não genotipado	p-valor
IMC <i>média(±DP)</i>	28,1 (±9,2)	28,2 (±3,2)	27,6 (±5,0)	0,544
Hipertensão <i>n(%)</i>	5 (41,7%)	6 (66,7%)	15 (48,4%)	0,548
Diabetes <i>n(%)</i>	4 (33,3%)	3 (33,3%)	5 (16,1%)	0,337
Dislipidemia <i>n(%)</i>	2 (16,7%)	3 (33,3%)	9 (29,0%)	0,748
Hipotireoidismo <i>n(%)</i>	2 (16,7%)	3 (33,3%)	3 (9,7%)	0,200
Câncer de mama <i>n(%)</i>	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,404
Hepatite C <i>n(%)</i>	5 (41,7%)	1 (11,1%)	0 (0,0%)	0,001
Tireoidopatia <i>n(%)</i>	3 (25,0%)	3 (33,3%)	3 (10,7%)	0,236
AF Câncer de mama <i>n(%)</i>	3 (25,0%)	6 (66,7%)	3 (27,3%)	0,118
AF Câncer de Ovário <i>n(%)</i>	0 (0,0%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)	0,073
Outros cânceres <i>n(%)</i>	8 (66,7%)	4 (44,4%)	5 (50,0%)	0,660

NOTA: Valor de p baseado nos testes de Kruskal-Wallis e no teste exato de Fischer
 IMC: índice de massa corpórea
 AF: Antecedente familiar

Todas as pacientes tiveram o cálculo de risco pelo Índice de Gail avaliado. O Gráfico 1 demonstra em *boxplot* o índice de Gail calculado para os diferentes grupos, utilizando a plataforma eletrônica disponível no endereço: www.mdcalc.com/gail-model-breast-cancer-risk.

Gráfico 1 – Risco de desenvolvimento de câncer de mama, em cinco anos e global (*lifetime risk*), calculado pelo índice de Gail



NOTA: Valor de p calculado pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância para comparação entre grupos foi ajustado pela correção de Bonferroni.

Conforme descrito por Gail e colaboradores, o cálculo de risco não se aplica a pacientes com diagnóstico prévio de câncer de mama. Por isso, foram excluídas 2 pacientes da análise: 1 paciente no grupo Gilbert, com diagnóstico prévio de câncer de mama; e 1 paciente no grupo Controle genotipado, com diagnóstico prévio de carcinoma *in situ* de mama. O Gráfico 1 permite identificar homogeneidade dos grupos ao avaliar o risco estimado de câncer de mama. A aparente heterogeneidade na análise global do risco de ocorrência de câncer em 5 anos ($p=0,038$) não resultou significância estatística quando ajustada na comparação entre grupos.

A Tabela 8 apresenta a distribuição os níveis séricos de bilirrubina total e suas frações conjugada e não-conjugada, nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado. A distribuição das medidas de bilirrubina foi significativamente maior no grupo Gilbert em relação ao grupo Controle não genotipado (bilirrubina total com $p<0,001$; bilirrubina direta $p<0,001$ e bilirrubina indireta com $p=0,002$). Não houve diferenças com significância estatística nas

comparações do grupo Gilbert com o Controle genotipado, tampouco entre o grupo controle genotipado e controle não genotipado. No Gráfico 2 é possível verificar as distribuições por meio dos gráficos de *boxplot* para cada um dos grupos.

Tabela 8 - Bilirrubina total e frações direta (conjugada) e indireta (não-conjugada) séricas nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado.

	Gilbert		Controle genotipado		Controle não genotipado		Comparações múltiplas entre grupos			
	média(±DP)	Mediana (IIQ)	média(±DP)	Mediana (IIQ)	média(±DP)	Mediana (IIQ)	p-valor	SG vs CG	SG vs CNG	CG vs CNG
Bilirrubina total (mg/dL)	0,73(±0,29)	0,29 (0,63-0,53)	0,62 (±0,57)	0,57 (0,4-0,35)	0,38 (±0,12)	0,12 (0,37-0,27)	0,001	0,163	<0,001	0,644
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,30 (±0,1)	0,1 (0,27-0,24)	0,28 (±0,28)	0,28 (0,19-0,14)	0,16 (±0,04)	0,04 (0,15-0,12)	<0,001	0,168	<0,001	0,443
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,43 (±0,2)	0,2 (0,35-0,3)	0,34 (±0,29)	0,29 (0,26-0,2)	0,22 (±0,09)	0,09 (0,21-0,16)	0,003	0,353	0,002	0,68

NOTA: Valor de p calculado pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância para comparação entre grupos foi ajustado pela correção de Bonferroni.

DP: Desvio Padrão

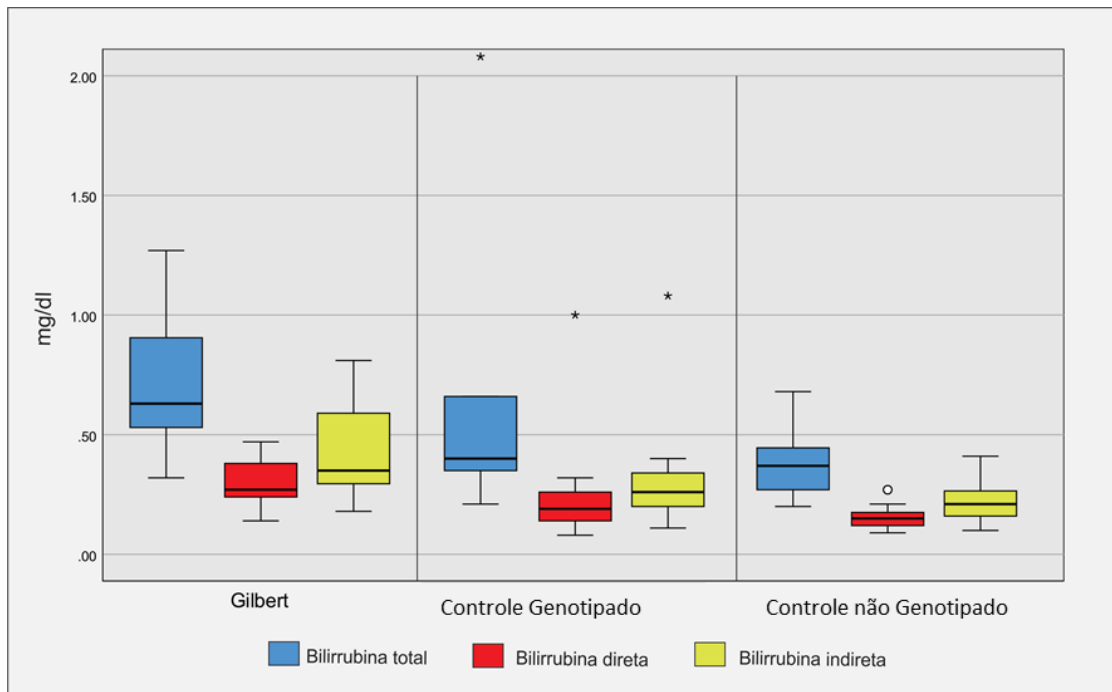
IIQ: Intervalo Interquartil

SG: Síndrome de Gilbert

CG: Controle genotipado

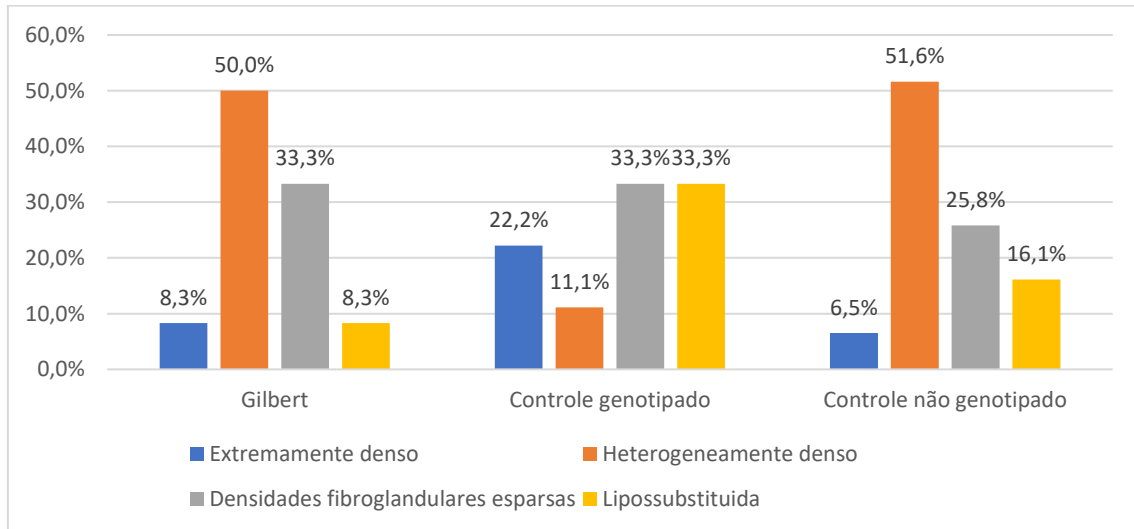
CNG: Controle não genotipado

Gráfico 2 - Distribuição das medidas de bilirrubina de acordo com os grupos nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado



A distribuição da densidade mamária na avaliação do radiologista mostrou o grupo Controle mais heterogêneo do que os demais. Enquanto no Controle 22,2% das mulheres foram classificadas com mamas extremamente densas, o grupo Gilbert e o Controle climatério tiveram 8,3% e 6,5%. O contrário foi observado na classificação heterogeneamente densa, onde o Controle contabilizou apenas 11,1% de mulheres enquanto o Gilbert e o Controle Climatério tiveram 50% e 51,6% com esta característica (Gráfico 3). Embora tenha-se observado heterogeneidade entre as categorias, não houve diferenças com significância estatística entre os grupos ($p=0,279$).

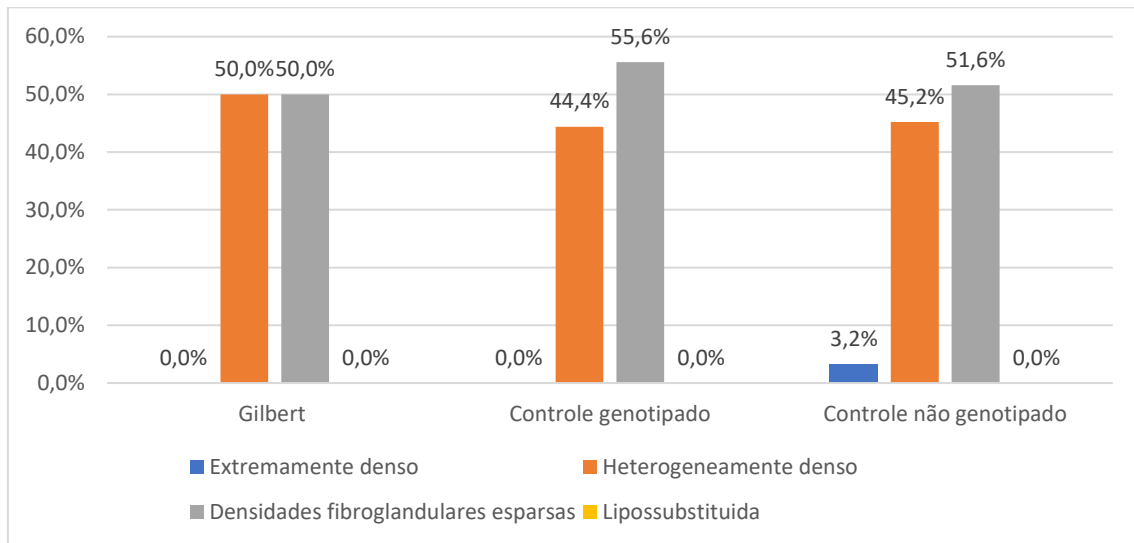
Gráfico 3 – Densidade mamária na avaliação do radiologista de acordo nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado



NOTA: Valor de $p=0,279$ baseado no teste exato de Fisher

O avaliador *Histogram* apresenta uma tendência a concentrar suas interpretações em heterogeneamente densas e densidades esparsas, conforme ilustrado no Gráfico 4. Este achado ocorre nos três grupos estudados de maneira homogênea.

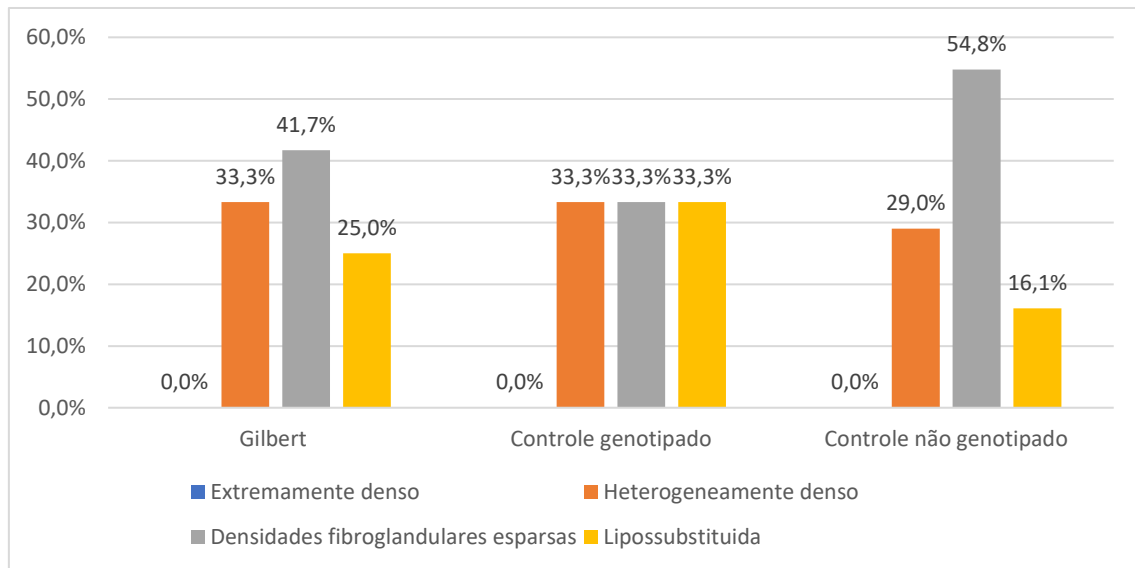
Gráfico 4 – Densidade mamária pelo avaliador *Histogram* de acordo com os grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado



NOTA: Valor de $p=0,999$ baseado no teste exato de Fisher

A distribuição da densidade mamária quando avaliada pela CNN se mostra mais próxima da observada na interpretação do radiologista. O Gráfico 5 ilustra distribuição semelhante entre os grupos Gilbert e Controle não genotipado.

Gráfico 5 – Densidade mamária aferida pelo CNN de acordo com os grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado



NOTA: Valor de $p=0,708$ baseado no teste exato de Fisher

A classificação da densidade mamária pelo *Histogram* e pelo CNN também se mostrou homogênea de acordo com os grupos investigados, $p=0,999$ e $p=0,708$, conforme observado na Tabela 9. O coeficiente de concordância apresentado na Tabela 10 foi de 0,403 para MMG vs *Histogram* ($p<0,001$), 0,386 para MMG vs CNN ($p<0,001$) e 0,336 para *Histogram* vs CNN ($p<0,001$).

Tabela 9 – Densidades mamárias avaliadas por radiologistas, pelo avaliador *Histogram* e pela CNN nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado

	Gilbert		Controle genotipado		Controle não genotipado		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Radiologista							
Extremamente denso	1	8,3%	2	22,2%	2	6,5%	0,279
Heterogeneamente denso	6	50,0%	1	11,1%	16	51,6%	
Densidades esparsas	4	33,3%	3	33,3%	8	25,8%	
Lipossubstituída	1	8,3%	3	33,3%	5	16,1%	
Histogram							
Extremamente denso	0	0,0%	0	0,0%	1	3,2%	0,999
Heterogeneamente denso	6	50,0%	4	44,4%	14	45,2%	
Densidades esparsas	6	50,0%	5	55,6%	16	51,6%	
Lipossubstituída	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	
CNN							
Extremamente denso	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0,708
Heterogeneamente denso	4	33,3%	3	33,3%	9	29,0%	
Densidades esparsas	5	41,7%	3	33,3%	17	54,8%	
Lipossubstituída	3	25,0%	3	33,3%	5	16,1%	

NOTA: Valor de p baseado no teste exato de Fischer
Kappa Radiologista vs *Histogram* 0,403, $p < 0,001$
Kappa Radiologista vs CNN 0,386, $p < 0,001$
Kappa *Histogram* vs CNN 0,336, $p < 0,001$

Na análise estratificada segundo os grupos de investigação o coeficiente de correlação *kappa* mais elevado foi para a comparação Radiologista vs CNN no grupo Controle genotipado com 0,700 e $p < 0,001$. No mesmo estrato os coeficientes *kappa* não foram significantes para a relação Radiologista vs *Histogram* e *Histogram* vs CNN. No grupo Gilbert o coeficiente *kappa* de 0,571 para MMG vs *Histogram* foi quantitativamente mais elevado, contudo todas as análises foram significantes, mesmo fenômeno observado no grupo Controle não genotipado (Tabela 10).

Tabela 10 – Coeficiente de concordância das densidades mamárias avaliadas por radiologistas, pelo avaliador *Histogram* e pela CNN estratificado segundo grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado

	Gilbert	Controle genotipado	Controle não genotipado
Radiologista vs <i>Histogram</i>			
<i>Kappa</i>	0,571	0,129	0,498
p-valor	0,010	0,343	<0,001
Radiologista vs CNN			
<i>Kappa</i>	0,381	0,700	0,291
p-valor	0,037	<0,001	0,008
<i>Histogram</i> vs CNN			
<i>Kappa</i>	0,333	0,333	0,339
p-valor	0,028	0,167	0,011

A Tabela 11 estabeleceu as estimativas diagnósticas da CNN na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias (extremamente densa, heterogeneamente densa, densidades fibroglandulares esparsas, lipossustituídas).

Tabela 11 – Estimativas diagnósticas da CNN na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias (continuação)

	Total		Gilbert		Controle genotipado		Controle não genotipado	
	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%
Extremamente densa								
Sensibilidade	0,00%	0,00% - 52,18%	0,00%	0,00% - 97,50%	0,00%	0,00% - 84,19%	0,00%	0,00% - 84,19%
Especificidade	100,00%	92,13% - 100,00%	100,00%	71,50% - 100,00%	100,00%	59,04% - 100,00%	100,00%	88,06% - 100,00%
Razão de verossimilhança positiva	-	-	-	-	-	-	-	-
Razão de verossimilhança negativa	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00
Valor preditivo positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor preditivo negativo	90,00%	90,00% - 90,00%	91,67%	91,67% - 91,67%	77,78%	77,78% - 77,78%	93,55%	93,55% - 93,55%
Acurácia	90,00%	78,19% - 96,67%	91,67%	61,52% - 99,79%	77,78%	39,99% - 97,19%	93,55%	78,58% - 99,21%
Heterogeneamente densa								
Sensibilidade	47,83%	26,82% - 69,41%	66,67%	22,28% - 95,67%	100,00%	2,50% - 100,00%	66,67%	22,28% - 95,67%
Especificidade	82,76%	64,23% - 94,15%	100,00%	54,07% - 100,00%	75,00%	34,91% - 96,81%	100,00%	54,07% - 100,00%
Razão de verossimilhança positiva	2,77	1,12 - 6,85	-	-	4	1,20 - 13,28	-	-
Razão de verossimilhança negativa	0,63	0,41 - 0,96	0,33	0,11 - 1,03	0	-	0,33	0,11 - 1,03
Valor preditivo positivo	68,75%	47,10% - 84,46%	100,00%	-	33,33%	13,09% - 62,41%	100,00%	-
Valor preditivo negativo	66,67%	56,66% - 75,37%	75,00%	49,18% - 90,29%	100,00%	-	75,00%	49,18% - 90,29%
Acurácia	67,31%	52,89% - 79,67%	83,33%	51,59% - 97,91%	77,78%	39,99% - 97,19%	83,33%	51,59% - 97,91%
Densidade esparsa								
Sensibilidade	73,33%	44,90% - 92,21%	50,00%	6,76% - 93,24%	100,00%	29,24% - 100,00%	75,00%	34,91% - 96,81%
Especificidade	62,16%	44,76% - 77,54%	62,50%	24,49% - 91,48%	100,00%	54,07% - 100,00%	52,17%	30,59% - 73,18%
Razão de verossimilhança positiva	1,94	1,16 - 3,24	1,33	0,35 - 5,03	-	-	1,57	0,87 - 2,81
Razão de verossimilhança negativa	0,43	0,18 - 1,03	0,8	0,26 - 2,45	0	-	0,48	0,14 - 1,69
Valor preditivo positivo	44,00%	31,98% - 56,77%	40,00%	15,03% - 71,53%	100,00%	-	35,29%	23,30% - 49,47%
Valor preditivo negativo	85,19%	70,54% - 93,25%	71,43%	44,99% - 88,43%	100,00%	-	85,71%	62,93% - 95,50%
Acurácia	65,38%	50,91% - 78,03%	58,33%	27,67% - 84,83%	100,00%	66,37% - 100,00%	58,06%	39,08% - 75,45%

continua

Tabela 11 – Estimativas diagnósticas da CNN na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias (conclusão)

	Total		Gilbert		Controle genotipado		Controle não genotipado	
	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%
Liposubstituída								
Sensibilidade	88,89%	51,75% - 99,72%	100,00%	2,50% - 100,00%	100,00%	29,24% - 100,00%	80,00%	28,36% - 99,49%
Especificidade	93,02%	80,94% - 98,54%	81,82%	48,22% - 97,72%	100,00%	54,07% - 100,00%	96,15%	80,36% - 99,90%
Razão de verossimilhança positiva	12,74	4,18 - 38,88	5,5	1,57 - 19,27	-	-	20,8	2,90 - 149,34
Razão de verossimilhança negativa	0,12	0,02 - 0,76	0	-	0	-	0,21	0,04 - 1,20
Valor preditivo positivo	72,73%	46,64% - 89,06%	33,33%	12,49% - 63,66%	100,00%	-	80,00%	35,78% - 96,64%
Valor preditivo negativo	97,56%	86,28% - 99,61%	100,00%	-	100,00%	-	96,15%	81,22% - 99,31%
Acurácia	92,31%	81,46% - 97,86%	83,33%	51,59% - 97,91%	100,00%	66,37% - 100,00%	93,55%	78,58% - 99,21%
Extremamente + heterogeneamente								
Sensibilidade	53,57%	33,87% - 72,49%	57,14%	18,41% - 90,10%	100,00%	29,24% - 100,00%	44,44%	21,53% - 69,24%
Especificidade	95,83%	78,88% - 99,89%	100,00%	47,82% - 100,00%	100,00%	54,07% - 100,00%	92,31%	63,97% - 99,81%
Razão de verossimilhança positiva	12,86	1,83 - 90,32	-	-	-	-	5,78	0,82 - 40,72
Razão de verossimilhança negativa	0,48	0,32 - 0,73	0,43	0,18 - 1,01	0	-	0,6	0,39 - 0,94
Valor preditivo positivo	93,75%	68,10% - 99,06%	100,00%	-	100,00%	-	88,89%	53,17% - 98,26%
Valor preditivo negativo	63,89%	54,09% - 72,65%	62,50%	41,47% - 79,68%	100,00%	-	54,55%	43,54% - 65,12%
Acurácia	73,08%	58,98% - 84,43%	75,00%	42,81% - 94,51%	100,00%	66,37% - 100,00%	64,52%	45,37% - 80,77%

NOTA: IC: Intervalo de confiança

Nesse sentido observou-se que diante de mamas densas (extremamente densa e heterogeneamente densa) a sensibilidade foi baixa no grupo Gilbert (57,14% e 100%, respectivamente) quando comparado ao grupo Controle genotipado, cuja sensibilidade e especificidade foi de 100%. O grupo Gilbert apresentou parâmetros semelhantes ao grupo Controle não genotipado, cuja sensibilidade foi de 44,44% e a especificidade de 92,31%. Em pacientes com mamas densas, a especificidade foi o parâmetro diagnóstico mais representativo dentre os avaliados, enquanto a acurácia foi um bom parâmetro para as mamas lipossustituídas (Tabela 11 - anexo). Os parâmetros do *Histogram* também foram avaliados com resultados próximos aos observados com a CNN (Tabela 12).

Tabela 12 – Estimativas diagnósticas do *Histogram* na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias (continuação)

	Total		Gilbert		Controle genotipado		Controle não genotipado	
	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%
Extremamente densa								
Sensibilidade	20,00%	0,51% - 71,64%	0,00%	0,00% - 97,50%	0,00%	0,00% - 84,19%	50,00%	1,26% - 98,74%
Especificidade	100,00%	92,45% - 100,00%	100,00%	71,50% - 100,00%	100,00%	59,04% - 100,00%	100,00%	88,06% - 100,00%
Razão de verossimilhança positiva	-	-	-	-	-	-	-	-
Razão de verossimilhança negativa	0,8	0,52 - 1,24	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00	0,5	0,13 - 2,00
Valor preditivo positivo	100,00%	-	-	-	-	-	100,00%	-
Valor preditivo negativo	92,16%	88,35% - 94,80%	91,67%	91,67% - 91,67%	77,78%	77,78% - 77,78%	96,67%	87,88% - 99,14%
Acurácia	92,31%	81,46% - 97,86%	91,67%	61,52% - 99,79%	77,78%	39,99% - 97,19%	96,77%	83,30% - 99,92%
Heterogeneamente densa								
Sensibilidade	41,86%	27,01% - 57,87%	83,33%	35,88% - 99,58%	100,00%	2,50% - 100,00%	75,00%	47,62% - 92,73%
Especificidade	79,31%	60,28% - 92,01%	83,33%	35,88% - 99,58%	62,50%	24,49% - 91,48%	86,67%	59,54% - 98,34%
Razão de verossimilhança positiva	2,02	0,91 - 4,48	5	0,81 - 31,00	2,67	1,09 - 6,52	5,63	1,50 - 21,08
Razão de verossimilhança negativa	0,73	0,54 - 1,00	0,2	0,03 - 1,24	0	-	0,29	0,12 - 0,69
Valor preditivo positivo	75,00%	57,53% - 86,92%	83,33%	44,64% - 96,88%	25,00%	11,99% - 44,92%	85,71%	61,56% - 95,74%
Valor preditivo negativo	47,92%	40,18% - 55,75%	83,33%	44,64% - 96,88%	100,00%	-	76,47%	57,62% - 88,60%
Acurácia	56,94%	44,73% - 68,57%	83,33%	51,59% - 97,91%	66,67%	29,93% - 92,51%	80,65%	62,53% - 92,55%
Densidade esparsa								
Sensibilidade	86,67%	59,54% - 98,34%	87,50%	47,35% - 99,68%	66,67%	9,43% - 99,16%	87,50%	47,35% - 99,68%
Especificidade	62,16%	44,76% - 77,54%	60,87%	38,54% - 80,29%	50,00%	11,81% - 88,19%	60,87%	38,54% - 80,29%
Razão de verossimilhança positiva	2,29	1,45 - 3,62	2,24	1,26 - 3,97	1,33	0,43 - 4,13	2,24	1,26 - 3,97
Razão de verossimilhança negativa	0,21	0,06 - 0,80	0,21	0,03 - 1,32	0,67	0,11 - 3,99	0,21	0,03 - 1,32
Valor preditivo positivo	48,15%	37,00% - 59,49%	43,75%	30,48% - 57,98%	40,00%	17,70% - 67,40%	43,75%	30,48% - 57,98%
Valor preditivo negativo	92,00%	75,54% - 97,72%	93,33%	68,49% - 98,90%	75,00%	33,39% - 94,72%	93,33%	68,49% - 98,90%
Acurácia	69,23%	54,90% - 81,28%	67,74%	48,63% - 83,32%	55,56%	21,20% - 86,30%	67,74%	48,63% - 83,32%

continua

Tabela 12 – Estimativas diagnósticas do *Histogram* na avaliação da densidade mamária quando comparada à análise do radiologista nas diferentes categorias (conclusão)

	Total		Gilbert		Controle genotipado		Controle não genotipado	
	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%	Estimativa	IC95%
Liposubstituída								
Sensibilidade	0,00%	0,00% - 33,63%	0,00%	0,00% - 97,50%	0,00%	0,00% - 70,76%	0,00%	0,00% - 52,18%
Especificidade	100,00%	91,78% - 100,00%	100,00%	71,51% - 100,00%	100,00%	54,07% - 100,00%	100,00%	86,77% - 100,00%
Razão de verossimilhança positiva	-	-	-	-	-	-	-	-
Razão de verossimilhança negativa	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00	1	1,00 - 1,00
Valor preditivo positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Valor preditivo negativo	82,69%	82,69% - 82,69%	91,67%	91,67% - 91,67%	66,67%	66,67% - 66,67%	83,87%	83,87% - 83,87%
Acurácia	82,69%	69,67% - 91,77%	91,67%	61,52% - 99,79%	66,67%	29,93% - 92,51%	83,87%	66,27% - 94,55%
Extremamente + heterogeneamente								
Sensibilidade	82,14%	63,11% - 93,94%	85,71%	42,13% - 99,64%	100,00%	29,24% - 100,00%	77,78%	52,36% - 93,59%
Especificidade	91,67%	73,00% - 98,97%	100,00%	47,82% - 100,00%	83,33%	35,88% - 99,58%	92,31%	63,97% - 99,81%
Razão de verossimilhança positiva	9,86	2,59 - 37,57	-	-	6	1,00 - 35,91	10,11	1,51 - 67,55
Razão de verossimilhança negativa	0,19	0,09 - 0,44	0,14	0,02 - 0,88	0	-	0,24	0,10 - 0,58
Valor preditivo positivo	92,00%	75,11% - 97,77%	100,00%	-	75,00%	33,39% - 94,72%	93,33%	67,70% - 98,94%
Valor preditivo negativo	81,48%	66,33% - 90,76%	83,33%	44,89% - 96,84%	100,00%	-	75,00%	55,48% - 87,84%
Acurácia	86,54%	74,21% - 94,41%	91,67%	61,52% - 99,79%	88,89%	51,75% - 99,72%	83,87%	66,27% - 94,55%

NOTA: IC: Intervalo de confiança



Discussão

5 Discussão

O estudo da Síndrome de Gilbert e suas influências na saúde vêm ganhando espaço nas pesquisas médicas, seja pela necessidade de estabelecer um diagnóstico diferencial para as hiperbilirrubinemias⁸³, pelo entendimento de como a afecção influencia o processo de metabolismo de drogas e medicamentos⁸⁴⁻⁸⁷, e pela consideração de correlação na gênese de doenças⁸⁸⁻⁹⁴.

A condição de metabolização errática de estrogênios poderia implicar no acúmulo de metabólitos os quais potencialmente atuariam diretamente na carcinogênese. O estrogênio é fundamentalmente metabolizado por reações de hidroxilação. A fase primária envolve diferentes enzimas citocromo P-450, que catalisam processos oxidativos da estrona (E1) e do estradiol (E2). Dos compostos formados, acredita-se que a 4-hidroxiestrona, após processos de metilação, sulfatação e reação com glutatona, resulte em quinonas com capacidade de formação de adutos de DNA. O 16 α -hidroxiestradiol resultante da atuação dos citocromos já foi relacionado a ligações covalentes e permanentes ao receptor de estrogênio, com conseqüente estimulação da proliferação celular⁹⁵.

Já os metabólitos metoxilatos derivados da ação da catecol O-metiltransferase (COMT) são descritos como possivelmente anticarcinogênicos⁴⁴. Pacientes com alelos que codificam COMT de baixa atividade tem risco duas vezes maior que aquelas com alelos selvagens⁹⁶. A

17 β -hidroxi desidrogenase possui particular importância pois realiza a conversão de estrona para estradiol⁹⁷. Sua atividade encontra-se aumentada em tecido neoplásico quando comparado com tecido mamário normal⁹⁸. O estradiol é considerado forma mais ativa de estrogênio⁹⁷.

Estudos demonstram que adutos de DNA podem ser gerados a partir de reações catecol-estrogênio-quinona, os quais poderiam atuar em carcinogênese não relacionada ao receptor de estrogênio (receptor-independente), como mutações iniciadoras do câncer^{36,49}. Regra geral, o metabolismo do estrogênio é balanceado, e poucos adutos de DNA relacionados ao estrogênio são formados. Caso ocorra desbalanço, maior será o número de reações catecol-estrogenio-quinona, com maior formação de adutos de DNA-estrogênio. Mulheres com alto risco para câncer de mama possuem níveis de adutos de DNA-estrogênio maiores que as de baixo risco⁹⁹.

Por meio das vias de sinalização mediadas pelo receptor de estrogênio (RE), identifica-se atividade proliferativa e de inibição da apoptose. A via clássica é estabelecida pela ligação da molécula de estrogênio com o receptor específico localizado no núcleo da célula. Esta ativação faz-se por dimerização a elementos estrogênio-responsivos em regiões de regulação dos genes, e também pela interação com fatores transcricionais, cofatores e correpressores o que pode alterar a expressão gênica³⁸.

Diferentes tipos de receptores estrogênicos (RE α e RE β), os quais possuem grande similaridade nos domínios de ligação do DNA, porém domínios de ligação ao ligante intensamente distintos, condicionam diferentes afinidades e também resposta transcricional distinta para cada composto¹⁰⁰. Ainda, foram identificados RE α e RE β localizados na mitocôndria que apresentam resposta

transcricional ao estímulo estrogênico. Já na membrana plasmática a molécula atua como fator de crescimento peptídico, causando ativação de quinases, como as MAPK (proteino-quinases ativadas por mitógenos) e elevando os níveis de segundos mensageiros, como cAMP (monofosfato cíclico de adenosina), importante modulador de processos fisiológicos³⁷. A interação entre diferentes processos transcricionais genômicos e vias associadas a segundos mensageiros podem representar importante papel no controle mediado por estrogênio de vias de proliferação celular e apoptose¹⁰¹.

Observando-se as associações prévias entre o polimorfismo UGT1A1*28 da UGT1A1 em pacientes com Síndrome de Gilbert e o metabolismo dos estrogênios, ainda há dúvidas quanto ao real impacto desta mutação na gênese do câncer de mama.

Estudo de Guillemette et al.¹⁰² avaliou a associação de polimorfismos de baixa atividade da UGT1A1 e susceptibilidade ao câncer estrogênio-dependente. Em caso-controle de 200 pacientes, identificou-se *Odds ratio* (OR) de 1,8 (IC 1,0–3,1) para pacientes afro-americanas na pré-menopausa. Outro estudo caso-controle conduzido em população chinesa com idade entre 25 e 64 anos identificou OR de 1,7 (IC 1,0-2,8) relacionando os polimorfismos UGT1A1 e o câncer de mama, para pacientes com menos de 40 anos¹⁰³. Outros estudos corroboram estes resultados¹⁰⁴. Estudo conduzido por Sparks et al.¹⁰⁵ avaliou o perfil sérico hormonal e dos polimorfismos de UGT1A1 em 163 pacientes com diagnóstico de câncer de mama. Foi identificado menor risco de câncer de mama RE negativo em pacientes homozigotas (7/7). Nestas mesmas pacientes, a dosagem sérica de estradiol foi 58% maior quando comparadas com pacientes com câncer de mama e alelos (6/6) ($p=0,01$). Entretanto, também são descritos

estudos negativos para tal relação. Em estudo caso-controle de pacientes caucasianas com diagnóstico de câncer de mama comparadas a pacientes sem a doença, identificou-se risco relativo (RR) estimado de 0,8 (IC 0,49 – 1,29). Quando avaliado o subgrupo de pacientes na pré-menopausa, o RR foi um pouco maior (RR=1,28, IC 0,38 – 4,64), porém não significante¹⁰⁶.

No presente estudo, a pesquisa para mutação do gene UGT1A1 foi restrita à inserção de uma cópia (TA)TAA no gene promotor, conforme descrito por Bosma e colaboradores¹¹. Este é considerado o principal polimorfismo do gene que resulta na expressão fenotípica da Síndrome de Gilbert em caucasianos, e foi por isso explorado no trabalho. Outros tipos de alterações genéticas são mais frequentemente associadas aos asiáticos, e são também menos frequentes. Em nosso trabalho, três pacientes autodeclaradas amarelas foram avaliadas (5,8% das pacientes), sendo duas no grupo Gilbert e uma no grupo Controle não genotipado.

Em nosso estudo, o antecedente familiar de câncer de mama foi heterogêneo no grupo Controle genotipado (66,7%) quando comparado com os grupos Síndrome de Gilbert (25,0%) e Controle não genotipado (27,3%), ainda que estatisticamente não significante ($p=0,118$). Ainda assim, os riscos para desenvolvimento de câncer de mama estimados foram similares entre os grupos. O índice de Gail é um método já consagrado de avaliação de risco para câncer de mama, e possivelmente um dos mais utilizados pela facilidade de sua aplicação, porém apresenta como maior limitação uma avaliação mais superficial do histórico familiar do probando¹⁰⁷.

Em nosso estudo, mamas extremamente densas representaram entre 6,5% (grupo controle não genotipado) e 22,2% (grupo controle genotipado)

quando avaliadas pelo radiologista, mas não foram representadas pela CNN. Essa menor prevalência de mamas extremamente densas é similar à descrita na literatura. Em 2014, Sprague e colaboradores estimaram em 7,4% de pacientes com mamas densas entre 40 e 74 anos nos Estados Unidos. Ao avaliar a proporção de mamas densas (extremamente densas e heterogeneamente densas), identificaram o percentual de 43,3% nesta mesma faixa etária¹⁰⁸, similar ao identificado nos diferentes grupos de nosso estudo (58,3%, 33,3%, 58,1% nos grupos Gilbert, Controle genotipado e Controle não genotipado, respectivamente).

A validação dos resultados obtidos pela CNN desenvolvida por Wu et al.⁷⁷ é parte das limitações deste estudo, e aparentemente se relaciona a um obstáculo frequente dos estudos envolvendo o emprego de *deep learning* como ferramenta de auxílio ao diagnóstico médico. Haibe-Kains e colaboradores, em carta comentando trabalho envolvendo o emprego de inteligência artificial no rastreamento mamográfico, assinalaram como lacunas na descrição da metodologia e dos códigos do algoritmo utilizado restringem o valor científico dos dados publicados, e faz recomendações para maior transparência e reprodutibilidade dos estudos¹⁰⁹. Dentre eles:

- explicitar definições dos parâmetros utilizados para controle do processo (“*hyperparameters*”) e sequências de instruções (“*pipelines*”);
- compartilhar códigos, através do uso de bibliotecas disponíveis para acesso público;
- oferecer acesso ao banco de dados usado, podendo ser utilizadas amostras representativas ou bases de dados de acesso público.

Park e colaboradores, em artigo revisando conceitos de inteligência artificial e seus potenciais usos na Medicina, descrevem distinções entre as terminologias utilizadas: na literatura médica, o termo validação se aplica à verificação da performance de um modelo. Esta validação pode ser interna (na mesma população de onde se originaram os dados) ou externa. Quando aplicado à inteligência artificial, o termo validação é parte dos três passos básicos de elaboração de um modelo (treinamento, validação, teste). Validação neste contexto é o acerto fino do modelo; ele será seguido do teste, o qual então verifica a performance¹¹⁰.

Os mesmos autores fazem colocações ressaltando a importância da validação externa no contexto de um modelo desenvolvido em IA. Isso porque esta técnica é vulnerável ao chamado “*overfitting*”, no qual a calibração exageraria a capacidade de performance, acabando por não ser reprodutível em outras populações e contextos. Neste sentido, estudos utilizando populações com condições específicas podem ter grande valor, uma vez que desafiam a força dos algoritmos desenvolvidos.

Nosso estudo avaliou a densidade mamária de pacientes pós-menopáusicas, com e sem o diagnóstico da Síndrome de Gilbert por meio da inteligência artificial de redes neurais convolucionais. O algoritmo CNN não foi capaz de identificar mamas extremamente densas (sensibilidade de 0%). Este achado pode estar relacionado ao tamanho da amostra, à baixa prevalência de mamas densas em pacientes na pós-menopausa tardia, ou também se relacionar a algoritmo excessivamente vinculado a um banco de dados específicos (o chamado “*overfitting*”), expressando baixa capacidade de reprodução dos resultados.

Entende-se que as mamas densas atuam como marcadores imagenológicos da exposição ao estrogênio. Ainda, sabe-se que a densidade mamária aumentada é, isoladamente, fator de risco para o câncer de mama. Além disso, mamas mais densas sabidamente diminuem consideravelmente a sensibilidade da mamografia como método de rastreamento, resultando inclusive nas recomendações pela complementação com outros exames de imagem. Em nosso estudo, sete (58%) pacientes apresentavam mamas densas (uma extremamente densa e seis heterogeneamente densas), grupo que poderia se beneficiar da adoção de algum método complementar à mamografia. Estudo publicado por Veenhuizen e colaboradores avaliou 40373 mulheres entre 50 e 75 anos submetidas a mamografia, com resultado de mamas extremamente densas. Estas foram randomizadas para realização de ressonância magnética, a qual resultou em aumento do diagnóstico de câncer de mama precoce, com aumento das taxas de resultados falso positivos¹¹¹. Corsetti e colaboradores, avaliando 8865 pacientes submetidas a rastreamento mamográfico e, diante de mamas densas, complementadas com ultrassonografia, referiram ser a combinação mamografia e ultrassonografia método eficaz para aumento da sensibilidade do rastreamento (86,7%), e redução dos cânceres de intervalo¹¹².

Em relação ao algoritmo CNN utilizado no trabalho, não há até o momento estudos de validação em outras populações, ainda que haja sugestão dos autores para que essa validação ocorra, contando inclusive com a disponibilização do código de maneira gratuita na rede. Ao mesmo tempo, observa-se grande pluralidade de desenvolvimento de outras redes neurais por diferentes grupos, o que inspira discussões sobre a empregabilidade dos algoritmos desenvolvidos, mas, principalmente, em como tal conhecimento

deveria ser devolvido como benefício à população-base dos dados utilizados. Por fazerem uso de gigantescos bancos de dados, os quais necessitam de correlação com dados clínicos, a quem pertenceria a propriedade intelectual e comercial dos modelos obtidos?¹¹³

Como já assinalamos, as amostras pequenas restringem a capacidade de gerar conclusões. A validação prévia do algoritmo de rede neural convolucional em outras populações consolidaria os resultados por nós obtidos. Em estudo transversal, a aplicabilidade do índice de Gail é restrita, sendo mais fielmente aplicável em coortes. Em contrapartida, trata-se do primeiro estudo específico de avaliação de densidade mamária por meio de rede neural convolucional na população com síndrome de Gilbert. São necessários mais estudos e com maior casuística para esclarecer o impacto da Síndrome de Gilbert nas condições mediadas pelo estrogênio. A validação de algoritmos de inteligência artificial em populações específicas é fundamental para a consolidação da real performance de cada modelo.



Conclusões

6 Conclusões

A sensibilidade da rede neural convolucional em identificar as mamas densas no grupo síndrome de Gilbert foi menor que a do grupo controle genotipado e mais semelhante à do grupo controle não genotipado. Quando comparada a avaliação da densidade mamária pelo radiologista, a rede neural convolucional possui concordância intermediária no grupo controle genotipado, porém baixa concordância em pacientes com síndrome de Gilbert.



Anexos

7 Anexos

Anexo A - Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia


MEDICINA
USP 100 ANOS
1932-2032

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 239ª reunião no dia 11 de Abril de 2017, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DOS ESTROGÊNIOS E SEUS METABÓLITOS EM MULHERES COM SÍNDROME DE GILBERT"** dos seguintes pesquisadores: Jonathan Yugo Maesaka, Suzane Kioko Ono, Flair José Carrilho, José Maria Soares Jr, Kátia Candido Carvalho, Gustavo Arantes Rosa Maciel, Edmund Chada Baracat

São Paulo, 11 de Abril de 2017.


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


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

**APROVADO PELO CONSELHO
DO DOG EM 19/04/2017**


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

Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa institucional – 21/06/2017 (continuação)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert

Pesquisador: Edmund Chada Baracat

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68392517.9.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.129.014

Apresentação do Projeto:

O projeto vai avaliar o metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert. Participarão do estudo mulheres entre 40 e 70 anos que apresentam genética prévia da região promotora do gene UGT1A1. O protocolo proposto não oferece riscos para o sujeito da pesquisa e seus resultados se positivo poderá auxiliar no diagnóstico da doença.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto é sobre o estudo da Síndrome de Gilbert (SG) que é descrita como uma hiperbilirrubinemia indireta que ocorre na ausência de patologias hepáticas ou quadros hemolíticos. A principal manifestação clínica é a icterícia intermitente e seu diagnóstico é realizado por exclusão. Os pesquisadores vão avaliar o metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em pacientes com Síndrome de Gilbert. Seus objetivos estão claros e a metodologia adequada para o desenvolvimento do projeto

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

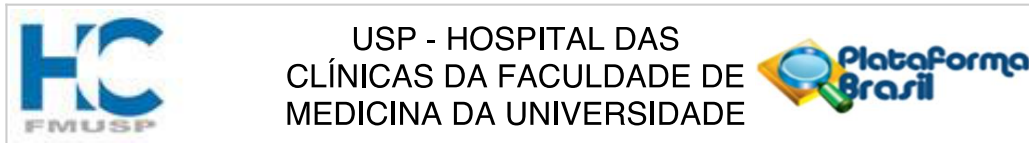
O protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância na especialidade médica e seus resultados podem contribuir para o diagnóstico da doença.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa institucional – 21/06/2017 (continuação)



Continuação do Parecer: 2.129.014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_873716.pdf	16/05/2017 09:58:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Sd_Gilbert_Jonathan.doc	16/05/2017 09:54:42	Edmund Chada Baracat	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	16/05/2017 09:53:32	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	anuencia_LIM.doc	09/05/2017 10:01:03	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	aprovacao_cep_departamento.pdf	09/05/2017 09:56:53	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	anuencia_disciplina_gastroenterologia.pdf	09/05/2017 09:56:31	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	cadastro_online_aprovado_abr2017.pdf	25/04/2017 16:15:58	Edmund Chada Baracat	Aceito
Brochura Pesquisa	Sd_Gilbert_Jonathan.docx	25/04/2017 16:13:46	Edmund Chada Baracat	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_Metabolismo_Estrogenio_Sd_Gilbert_mar17_modificado.doc	25/04/2017 16:12:38	Edmund Chada Baracat	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo B - Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa institucional – 21/06/2017 (conclusão)



Continuação do Parecer: 2.129.014

Ausência	TCLE_Metabolismo_Estrogenio_Sd_Gil bert_mar17_modificado.doc	25/04/2017 16:12:38	Edmund Chada Barcat	Aceito
----------	---	------------------------	------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

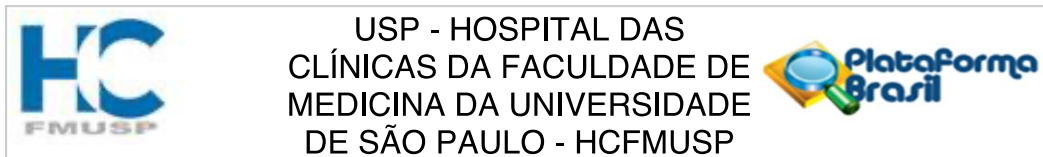
Não

SAO PAULO, 21 de Junho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa institucional – 08/07/2021 (continuação)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação do metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert

Pesquisador: Edmund Chada Baracat

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68392517.9.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.835.486

Apresentação do Projeto:

A Emenda solicitada pelo pesquisador trata-se da solicitação de algumas alterações no processo aprovado. Os pesquisadores informam a mudança do título do estudo de "Avaliação do metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert" para "Avaliação da densidade mamográfica com o uso de inteligência artificial por redes neurais convolucionais em mulheres na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert: estudo piloto". Ainda informam que o recrutamento de 40 pacientes teve que ser alterado para 27, pois houve um problema no recrutamento, devido ao cenário atual de pandemia. Por esta razão, os pesquisadores estão incluindo mais uma análise da imagem já obtida das pacientes recrutadas. A justificativa da emenda está adequada para a continuidade do estudo e não altera os riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

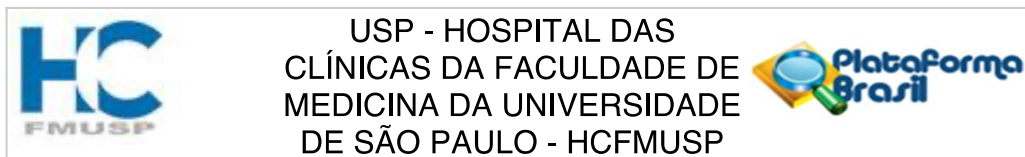
Os pesquisadores vão avaliar a densidade mamográfica com o uso de inteligência artificial por redes neurais convolucionais em mulheres na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert. A alteração nos objetivos não alteram a casuística nem incluem procedimentos no sujeito da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A emenda solicitada não altera os riscos para o sujeito da pesquisa.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa institucional – 08/07/2021 (continuação)



Continuação do Parecer: 4.835.486

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda está adequada para a continuidade do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As alterações do novo TCLE estão adequadas para a continuidade do projeto.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendamos sua aprovação

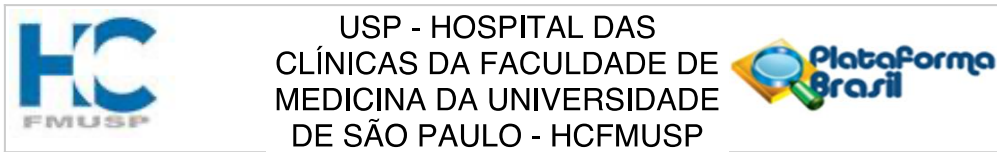
Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1767172_E1.pdf	01/06/2021 11:00:39		Aceito
Outros	FORMULARIO_SUBMISSAO_EMENDA.pdf	01/06/2021 10:57:20	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	justificativa_emenda.pdf	01/06/2021 10:56:40	Edmund Chada Baracat	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_EMENDA.docx	01/06/2021 10:56:08	Edmund Chada Baracat	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_emenda.doc	01/06/2021 10:40:43	Edmund Chada Baracat	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_emenda.docx	01/06/2021 10:40:00	Edmund Chada Baracat	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	16/05/2017 09:53:32	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	anuencia_LIM.doc	09/05/2017 10:01:03	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	aprovacao_cep_departamento.pdf	09/05/2017 09:56:53	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	anuencia_disciplina_gastroenterologia.pdf	09/05/2017 09:56:31	Edmund Chada Baracat	Aceito
Outros	cadastro_online_aprovado_abr2017.pdf	25/04/2017 16:15:58	Edmund Chada Baracat	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa institucional – 08/07/2021 (conclusão)



Continuação do Parecer: 4.835.486

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Julho de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão 1 (continuação)**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação do metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert.

2. PESQUISADORES:

1) Pesquisador Principal: Jonathan Yugo Maesaka
CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente do setor de Mastologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

2) Pesquisadora Responsável: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat
CARGO/FUNÇÃO: Professor titular da disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: 28085-SP
UNIDADE DO HCFMUSP: Setor de mastologia da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

A Sra. está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa “Avaliação do metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert”, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Edmund Chada Baracat.

O objetivo deste projeto é avaliar o metabolismo do estrogênio em mulheres portadoras da Síndrome de Gilbert, uma condição muito frequente na população. A Síndrome de Gilbert é o nome dado ao aumento de bilirrubinas indiretas, e que leva a quadros de icterícia intermitente.

A Sra. tem o direito de não participar deste estudo. Se não quiser participar do estudo, isto não irá interferir no seu tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Se decidir integrar este estudo, a Sra. participará de uma entrevista individual que durará aproximadamente 15 minutos, sendo realizada por mim ou por outro pesquisador da minha equipe. Posteriormente, será submetida a um exame de mamografia, que se trata de um exame de raio-X feito na mama para detectar precocemente o câncer de mama; ultrassonografia mamária, que é um exame de imagem dinâmico que também atua na identificação de doenças da mama; e a coleta de sangue para realização de exames.

Página 1 de 4

Rubrica do Participante _____

Rubrica do Pesquisador _____

continua

Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão 1 (continuação)**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Participando do estudo, haverá necessidade de vir para a consulta médica e exames que, entretanto, estão exatamente de acordo com a rotina do ambulatório. Você pode achar que determinadas perguntas da entrevista lhe incomodam, porque as informações que coletamos são sobre seus hábitos pessoais (alimentação, tabagismo e etc.). A mamografia é um exame bastante seguro, mas não está isento de riscos. Você deve entender que não é um exame 100% eficaz na detecção de todas as doenças da mama. E que nem todas as lesões identificadas são câncer, podendo ser solicitados exames adicionais. Por haver exposição a radiação, você poderá apresentar irritação da pele (dermatite actínica). Todos os riscos descritos tem chances muito baixas de acontecerem, mas caso aconteçam, receberá toda a assistência necessária no HCFMUSP. Além disso, a compressão da mama, apesar de um pouco desconfortável, é necessária para obter a melhor imagem com a menor quantidade de radiação. A ultrassonografia é exame não invasivo, seguro e que não utiliza radiação. A coleta de sangue é um procedimento seguro, porém alguns pacientes podem sentir discreta dor durante sua realização, e pode restar uma mancha arroxeadada no local (equimose), que é passageira.

Com sua entrevista ajudará que entendamos melhor como as alterações decorrentes da Síndrome de Gilbert, podem interferir no metabolismo e no risco para Câncer de Mama. Diretamente, será verificado se a sra. tem câncer de mama ou lesões que possam se tornar câncer de mama em você. Portanto, pode-se descobrir doenças em fase inicial que resultarão em melhores chances no tratamento, caso eles existam. O conhecimento adquirido neste estudo pode beneficiar outras pessoas.

Como foi dito acima, seu nome não aparecerá em nenhum formulário a ser preenchido por nós. Nenhuma publicação partindo destas entrevistas revelará os nomes de quaisquer participantes da pesquisa. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Além disso, garantimos que não sofrerá qualquer discriminação no seu seguimento, sendo acompanhado no Ambulatório de Mastologia da Clínica Ginecológica do HCFMUSP, conforme rotina do serviço.

O acesso ao projeto é de forma voluntária. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

O material biológico coletado será armazenado e processado seguindo os parâmetros de rotina estabelecidos pela Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é Jonathan Yugo Maesaka que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 10º andar – sala 10166 Telefones (11) 2661.7621 / (11) 2661.6647, e-mail jonathan.maesaka@hc.fm.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética

Página 2 de 4

Rubrica do Participante _____

Rubrica do Pesquisador _____

continua

Anexo D – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão 1 (continuação)**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CapPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5o andar – tel: (11) 2661-7585; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Avaliação do metabolismo dos estrogênios e seus metabólitos em mulheres com Síndrome de Gilbert”.

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr. Edmund Chada Baracat ou pessoa(s) por ele delegada(s) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via assinada pelo pesquisador. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo que a equipe de pesquisa tenha acesso ao meu prontuário para a coleta de dados clínicos, tais como resultados de exames laboratoriais, de imagem e biópsias, quando disponíveis. Concordo que seja coletada e analisada amostra do meu sangue. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Página 3 de 4

Rubrica do Participante _____

Rubrica do Pesquisador _____

continua

Anexo E – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão 2 (continuação)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa – **Avaliação da densidade mamográfica com uso de inteligência artificial por redes neurais convolucionais em pacientes na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert**

Pesquisador responsável – Edmund Chada Baracat

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

A Sra. está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa “Avaliação da densidade mamográfica com uso de inteligência artificial por redes neurais convolucionais em pacientes na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert”, de responsabilidade do Prof. Dr. Edmund Chada Baracat.

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

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

O objetivo deste projeto é avaliar o metabolismo do estrogênio em mulheres portadoras da Síndrome de Gilbert, uma condição muito frequente na população. A Síndrome de Gilbert é uma doença que causa aumento de bilirrubinas indiretas, e que leva a quadros de icterícia intermitente.

Se decidir participar este estudo, a Sra. fará uma entrevista individual que durará aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, será submetida a um exame de mamografia, que se trata de um exame de raio-X feito na mama; uma ultrassonografia mamária, que é um exame de imagem e coleta de sangue para realização de exames.

Você pode achar que determinadas perguntas da entrevista lhe incomodam, porque as informações que coletamos são sobre seus hábitos pessoais (alimentação, tabagismo e etc.). A mamografia é um exame bastante seguro, mas não está isento de riscos. Você deve entender que não é um exame 100% eficaz na detecção de todas as doenças da mama. E que nem todas as lesões identificadas são cancer, podendo ser solicitados exames adicionais. Por haver exposição a radiação, você poderá apresentar irritação da pele (dermatite actínica). Todos os riscos descritos tem chances muito baixas de acontecerem, mas caso aconteçam, receberá toda a assistência necessária no HCFMUSP. Além disso, a compressão da mama, apesar de um pouco desconfortável, é necessária para obter a melhor imagem com a menor quantidade de radiação. A ultrassonografia é exame não invasivo, seguro e que não utiliza radiação. A coleta de sangue é um procedimento seguro, porém alguns pacientes podem sentir discreta dor durante sua realização, e pode restar uma mancha arroxeadada no local (equimose), que é passageira. Faremos uso de um programa de computador na avaliação das imagens da sua mamografia, o que não modifica o exame convencional já realizado.

Sua entrevista ajudará que entendamos melhor como as alterações decorrentes da Síndrome de Gilbert, podem interferir no metabolismo e no risco para Câncer de Mama. Diretamente, será verificado se a sra. tem câncer de mama ou lesões que possam se tornar câncer em você. Portanto, pode-se descobrir doenças em fase inicial que resultarão em melhores chances no tratamento, caso eles existam. O conhecimento adquirido neste estudo pode beneficiar também outras pessoas.

Seu nome não aparecerá em nenhum formulário a ser preenchido por nós. Nenhuma publicação partindo destas entrevistas revelará os nomes de quaisquer participantes da pesquisa. Não esperamos que você possa ter

Continua

Anexo E – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão 2 (continuação)

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

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Jonathan Yugo Maesaka que pode ser encontrado à Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255 Instituto Central do Hospital das Clínicas 10º andar – São Paulo, CEP:05403-000 Telefone: 55-11-2661-7621.

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

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

Sua participação no estudo é totalmente voluntária e você poderá interrompê-la a qualquer momento. Sua decisão de não participar ou de se retirar do estudo, não prejudicará nem afetará seu atendimento médico atual ou futuro, nesta Instituição. Entretanto, se decidir não participar mais, você deverá notificar imediatamente o seu médico. Isto é para sua própria segurança.

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

Fui suficientemente informado a respeito do estudo - **Avaliação da densidade mamográfica com uso de inteligência artificial em pacientes na pós-menopausa com Síndrome de Gilbert**

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dr. Edmund Chada Baracat / Dr. Jonathan Yugo Maesaka sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

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

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

Assinatura do participante / representante legal

___/___/___
Data

Assinatura do responsável pelo estudo

___/___/___
Data

Continua

Anexo E – Termo de consentimento livre e esclarecido, versão 2 (conclusão)**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

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



Referências

8 Referências

1. Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1999;14(10):960-6.
2. Gilbert A, Lereboullet P. La cholémie simple familiale. *Sem Med*. 1901;21:241-48.
3. Meulengracht E. Icterus Intermittens Juvenilis. Chronischer intermittierender juveniler Subikterus. *Klin Wochenschr*1939. p. 118.
4. Dameshek W, Singer K. Familial nonhemolytic jaundice - Constitutional hepatic dysfunction with indirect van den Bergh reaction. *Archives of Internal Medicine*. 1941;67(2):259-85.
5. Rozendaal HM, Comfort MW, Snell AM. Slight and latent jaundice - The significance of elevated concentrations of bilirubin giving an indirect van den Bergh reaction. *Journal of the American Medical Association*. 1935;104:374-81.
6. Alwall N. On hereditary, non-hemolytic bilirubinemia. *Acta Med Scand*. 1946;123(6):560-95.
7. Hirschfield GM, Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2006;43:340-3.
8. Owens D, Sherlock S. Diagnosis of Gilbert's syndrome: role of reduced caloric intake test. *Br Med J*. 1973;3(5880):559-63.
9. Arias IM, London IM. Bilirubin glucuronide formation in vitro; demonstration of a defect in Gilbert's disease. *Science*. 1957;126(3273):563-4.
10. Black M, Billing B. Hepatic bilirubin udp-glucuronyl transferase activity in liver disease and gilberts syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1969;280(23):1266-&.
11. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, Deboer A, Oostra BA, et al. THE GENETIC-BASIS OF THE REDUCED EXPRESSION OF BILIRUBIN UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASE-1 IN GILBERTS-SYNDROME. *New England Journal of Medicine*. 1995;333(18):1171-5.
12. Bosma P. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *Journal of Hepatology*. 2003;38(1):107-17.
13. Hsieh TY, Shiu TY, Huang SM, Lin HH, Lee TC, Chen PJ, et al. Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2007;17(4):229-36.
14. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet*. 1996;347(9001):578-81.
15. Aono S, Adachi Y, Uyama E, Yamada Y, Keino H, Nanno T, et al. Analysis of genes for bilirubin udp-glucuronosyltransferase in gilberts-syndrome. *Lancet*. 1995;345(8955):958-9.
16. Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. *Hepatology*. 2000;32(4):792-5.
17. Sato H, Adachi Y, Koiwai O. The genetic basis of Gilbert's syndrome. *Lancet*. 1996;347(9001):557-8.
18. Yamamoto K, Sato H, Fujiyama Y, Doida Y, Bamba T. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*. 1998;1406(3):267-73.
19. Hoskins JM, Marcuello E, Altes A, Marsh S, Maxwell T, Van Booven DJ, et al. Irinotecan pharmacogenetics: Influence of pharmacodynamic genes. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(6):1788-96.
20. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
21. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde. Brasília (DF) 2019.

22. Key T, Appleby P, Reeves G, Roddam A, Helzlsouer K, Alberg A, et al. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British Journal of Cancer*. 2011;105(5):709-22.
23. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J. A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Statistics in Medicine*. 2004;23(7):1111-30.
24. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2017;317(23):2402-16.
25. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women - Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2002;288(3):321-33.
26. Neuhouser ML, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL, et al. Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *Jama Oncology*. 2015;1(5):611-21.
27. Seitz HK, Pelucchi C, Bagnardi V, La Vecchia C. Epidemiology and Pathophysiology of Alcohol and Breast Cancer: Update 2012. *Alcohol and Alcoholism*. 2012;47(3):204-12.
28. Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, Bernstein JL, Malhotra J, Friedman DN, et al. Breast Cancer After Chest Radiation Therapy for Childhood Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(21):2217-+.
29. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun LM, Stone J, Fishell E, et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(3):227-36.
30. Willett W, Tamini R, Hankinson S, Hazra A, Eliassen A, Colditz G. Nongenetic factors in the causation of breast cancer. In: Harris J, Lippman M, Morrow M, Osborne C, editors. *Diseases of the breast*. 5th ed. Philadelphia: LWW; 2014.
31. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2017;67(4):291-303.
32. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
33. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-74.
34. van't Veer LJ, Dai HY, van de Vijver MJ, He YDD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
35. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, et al. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(8):717-29.
36. Cavalieri E, Rogan E. The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers. *Molecular Aspects of Medicine*. 2014;36:1-55.
37. Levin ER. Genome and hormones: Gender differences in physiology - Invited review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *Journal of Applied Physiology*. 2001;91(4):1860-7.
38. Yager JD, Davidson NE. Mechanisms of disease: Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(3):270-82.
39. Morabia A, Zhang FF. History of medical screening: from concepts to action. *Postgraduate Medical Journal*. 2004;80(946):463-9.
40. NCCN clinical practice guidelines in oncology [Internet]. 2016. Available from: www.nccn.org.
41. Beatson G. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet*. 1896;148(3803):162-5.
42. Boyd S. On Oöphorectomy in the Treatment of Cancer. *Br Med J*. 1897;2(1918):890-6.

43. Baglietto L, Severi G, English DR, Krishnan K, Hopper JL, McLean C, et al. Circulating Steroid Hormone Levels and Risk of Breast Cancer for Postmenopausal Women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010;19(2):492-502.
44. Clemons M, Goss P. Mechanisms of disease - Estrogen and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(4):276-85.
45. Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, et al. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncology*. 2013;14(10):1009-19.
46. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: Data from the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology*. 2000;152(10):950-64.
47. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast-cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(24):1879-86.
48. Drinkwater N, Sugden B. Mechanisms of Carcinogenesis. In: Sherman C, Hossfeld D, Love R, Bosch F, editors. *Manual of Clinical Oncology* 5th ed. Berlin: Springer; 1990.
49. Cavalieri E, Stack D, Devanesan P, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, et al. Molecular origin of cancer: Catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20):10937-42.
50. Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2000(27):67-73.
51. Astolfi R, Bugano D, Francisco A, de Souza M, Ono-Nita S, Baracat E. Is Gilbert Syndrome a new risk factor for breast cancer? *Medical Hypotheses*. 2011;77(2):162-4.
52. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, et al. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*. 1997;7(4):255-69.
53. Belanger A, Hum DW, Beaulieu M, Levesque E, Guillemette C, Tchernof A, et al. Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998;65(1-6):301-10.
54. Bugano D, Conforti-Froes N, Yamaguchi N, Baracat E. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2008;29(4):313-20.
55. Kopans D. *Breast imaging*. 3rd ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
56. Carneiro PC. *Classificação mamográfica por densidade mamária utilizando atributos de intensidade e textura*: Universidade Federal de Uberlândia; 2015.
57. Pisano ED, Gatsonis C, Hendrick E, Yaffe M, Baum JK, Acharyya S, et al. Diagnostic performance of digital versus film mammography for breast-cancer screening. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(17):1773-83.
58. Ministério da Saúde. Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil - Sumário Executivo. In: Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva, editor. 3a Ed ed. online: Biblioteca Virtual em Saúde Prevenção e Controle de Câncer; 2017.
59. Boyd NF, Byng JW, Jong RA, Fishell EK, Little LE, Miller AB, et al. Quantitative classification of mammographic densities and breast-cancer risk - results from the canadian national breast screening study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87(9):670-5.
60. Wolfe JN. Risk for breast-cancer development determined by mammographic parenchymal pattern. *Cancer*. 1976;37(5):2486-92.
61. Wolfe JN. Breast patterns as an index of risk for developing breast-cancer. *American Journal of Roentgenology*. 1976;126(6):1130-9.
62. Gram IT, Funkhouser E, Tabar L. The Tabar classification of mammographic parenchymal patterns. *European Journal of Radiology*. 1997;24(2):131-6.
63. Sickles E, D'Orsi C, Bassett Lea. *ACR BI-RADS Mammography*. Reston, VA: American College of Radiology; 2013.

64. Colégio Brasileiro de Radiologia. Sistema de laudos e registro de dados de imagem da mama. Atlas BI-RADS do ACR. 5a Ed. 2016.
65. Byng JW, Boyd NF, Fishell E, Jong RA, Yaffe MJ. The quantitative-analysis of mammographic densities. *Physics in Medicine and Biology*. 1994;39(10):1629-38.
66. Abdolell M, Tsuruda KM, Lightfoot CB, Payne JI, Caines JS, Iles SE. Utility of relative and absolute measures of mammographic density vs clinical risk factors in evaluating breast cancer risk at time of screening mammography. *British Journal of Radiology*. 2016;89(1059):6.
67. Eriksson M, Czene K, Pawitan Y, Leifland K, Darabi H, Hall P. A clinical model for identifying the short-term risk of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2017;19:8.
68. Gubern-Merida A, Kallenberg M, Platel B, Mann RM, Marti R, Karssemeijer N. Volumetric Breast Density Estimation from Full-Field Digital Mammograms: A Validation Study. *Plos One*. 2014;9(1):8.
69. Haykin S. *Redes Neurais*. 2a Ed ed: Bookman.
70. McCulloch WS, Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity (reprinted from bulletin of mathematical biophysics, vol 5, pg 115-133, 1943). *Bulletin of Mathematical Biology*. 1990;52(1-2):99-115.
71. Lopes IL, Santos FAO, Pinheiro CAM. *Inteligência Artificial*. 1a Ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014.
72. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)-A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *Journal of Biomedical Informatics*. 2009;42(2):377-81.
73. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999(41):95-8.
74. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990;215(3):403-10.
75. Souza M. Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert) em pacientes portadoras de hepatite crônica C e em controles sadios.: Universidade de São Paulo; 2009.
76. Erel CT, Esen G, Seyisoglu H, Elter K, Uras C, Ertungealp E, et al. Mammographic density increase in women receiving different hormone replacement regimens. *Maturitas*. 2001;40(2):151-7.
77. Wu N, Geras KJ, Shen YQ, Su JY, Kim G, Kim E, et al. Breast density classification with deep convolutional neural networks. 2018 *Ieee International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (Icassp)*. 2018:6682-6.
78. Daniel WW. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. 10th Ed ed. New York: John Wiley & Sons; 2013.
79. Zhou X, Obuchowski N, McClish D. *Statistical Methods in Diagnostic Medicine*. 2nd Ed. ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2011.
80. Altman D, Machin D, Bryant T, MJ G. *Statistics with confidence* 2nd Ed. ed: BMJ Books; 2000.
81. Mercaldo ND, Lau KF, Zhou XH. Confidence intervals for predictive values with an emphasis to case-control studies. *Statistics in Medicine*. 2007;26(10):2170-83.
82. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
83. Carvalho CG, Castro SM, Santin AP, de Azevedo LA, Pereira MLS, Giugliani R. Polymorphic Variants of UGT1A1 in Neonatal Jaundice in Southern Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2010;56(5):366-7.
84. Gil J, Sasiadek MM. Gilbert syndrome: the UGT1A1*28 promoter polymorphism as a biomarker of multifactorial diseases and drug metabolism. *Biomarkers in Medicine*. 2012;6(2):223-30.
85. Meza-Junco J, Chu QSC, Christensen O, Rajagopalan P, Das S, Stefanyschyn R, et al. UGT1A1 polymorphism and hyperbilirubinemia in a patient who received sorafenib. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2009;65(1):1-4.

86. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guerin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: A molecular and clinical study of 75 patients. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(15):5151-9.
87. Takano M, Sugiyama T. UGT1A1 polymorphisms in cancer: impact on irinotecan treatment. *Pharmacogenomics & Personalized Medicine*. 2017;10:61-8.
88. Breimer LH, Mikhailidis DP. Does bilirubin protect against developing diabetes mellitus? *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2016;30(4):728-37.
89. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: A review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. *Progress in Lipid Research*. 2013;52(2):193-205.
90. Freisling H, Khoei NS, Viallon V, Wagner KH. Gilbert's syndrome, circulating bilirubin and lung cancer: a genetic advantage? *Thorax*. 2020;75(11):916-7.
91. Higashi Y, Maruhashi T, Noma K, Kihara Y. Oxidative stress and endothelial dysfunction: Clinical evidence and therapeutic implications. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2014;24(4):165-9.
92. Lingenhel A, Kollerits B, Schwaiger JP, Hunt SC, Gress R, Hopkins PN, et al. Serum bilirubin levels, UGT1A1 polymorphisms and risk for coronary artery disease. *Experimental Gerontology*. 2008;43(12):1102-7.
93. McCarty MF. "Iatrogenic Gilbert syndrome" - A strategy for reducing vascular and cancer risk by increasing plasma unconjugated bilirubin. *Medical Hypotheses*. 2007;69(5):974-94.
94. Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008;198(1):1-11.
95. Swaneck GE, Fishman J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16-alpha-hydroxyestrone to estradiol-receptor in human-breast cancer-cells - characterization and intranuclear localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(21):7831-5.
96. Lavigne J, Helzlsouer K, Huang H, Strickland P, Bell D, Selmin O, et al. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Research*. 1997;57(24):5493-7.
97. Mindnich R, Moller G, Adamski J. The role of 17 beta-hydroxy steroid dehydrogenases. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004;218(1-2):7-20.
98. Vermeulen A, Deslypere J, Paridaens R. Steroid dynamics in the normal and carcinomatous mammary-gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1986;25(5B):799-802.
99. Yager J. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention - A review. *Steroids*. 2015;99:56-60.
100. Pettersson K, Gustafsson JA. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual Review of Physiology*. 2001;63:165-92.
101. Marquez DC, Pietras RJ. Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. *Oncogene*. 2001;20(39):5420-30.
102. Guillemette C, Millikan RC, Newman B, Housman DE. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer Research*. 2000;60(4):950-6.
103. Adegoke OJ, Shu XO, Gao YT, Cai QY, Breyer J, Smith J, et al. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) and risk of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004;85(3):239-45.
104. Cheng TC, Chen ST, Huang CS, Fu YP, Yu JC, Cheng CW, et al. Breast cancer risk associated with genotype polymorphism of the catechol estrogen-metabolizing genes: A multigenic study on cancer susceptibility. *International Journal of Cancer*. 2005;113(3):345-53.
105. Sparks R, Ulrich CM, Bigler J, Tworoger SS, Yasui Y, Rajan KB, et al. UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase polymorphisms, sex hormone concentrations, and tumor receptor status in breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 2004;6(5):R488-R98.

106. Guillemette C, De Vivo I, Hankinson SE, Haiman CA, Spiegelman D, Housman DE, et al. Association of genetic polymorphisms in UGT1A1 with breast cancer and plasma hormone levels. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2001;10(6):711-4.
107. Terry MB, Liao YY, Whittemore AS, Leoce N, Buchsbaum R, Zeinotnar N, et al. 10-year performance of four models of breast cancer risk: a validation study. *Lancet Oncology*. 2019;20(4):504-17.
108. Sprague BL, Gangnon RE, Burt V, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Wellman RD, et al. Prevalence of Mammographically Dense Breasts in the United States. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(10):6.
109. Haibe-Kains B, Adam GA, Hosny A, Khodakarami F, Shreddha T, Kusko R, et al. Transparency and reproducibility in artificial intelligence. *Nature*. 2020;586(7829):E14-+.
110. Park SH, Han K. Methodologic Guide for Evaluating Clinical Performance and Effect of Artificial Intelligence Technology for Medical Diagnosis and Prediction. *Radiology*. 2018;286(3):800-9.
111. Veenhuizen SGA, de Lange SV, Bakker MF, Pijnappel RM, Mann RM, Monninkhof EM, et al. Supplemental Breast MRI for Women with Extremely Dense Breasts: Results of the Second Screening Round of the DENISE Trial. *Radiology*. 2021;299(2):278-86.
112. Corsetti V, Houssami N, Ghirardi M, Ferrari A, Speziani M, Bellarosa S, et al. Evidence of the effect of adjunct ultrasound screening in women with mammography-negative dense breasts: Interval breast cancers at 1 year follow-up. *European Journal of Cancer*. 2011;47(7):1021-6.
113. Sidebottom R, Lyburn I, Brady M, Vinnicombe S. Fair shares: building and benefiting from healthcare AI with mutually beneficial structures and development partnerships. *British Journal of Cancer*.4.