

**LUIS GUSTAVO RAIMUNDO**

**Homocisteína e cisteína séricas como marcadores  
epigenéticos de prognóstico e preditivos de  
resposta em tumores de mama**

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

Programa de Oncologia

Orientação: Profa. Dra. Mariangela Correa

São Paulo  
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Raimundo, Luis Gustavo

Homocisteína e cisteína séricas como marcadores epigenéticos de prognóstico e preditivos de resposta em tumores de mama / Luis Gustavo Raimundo. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Oncologia.

Orientadora: Mariangela Correa.

Descritores: 1.Oncologia 2.Neoplasias da mama 3.Biologia molecular 4.Epigênese genética/fisiologia 5.Repressão epigenética 6.Metilação de DNA 7.Prognóstico 8.Análise de sobrevida 9.Marcadores biológicos de tumor 10.Homocisteína 11.Cisteína 12.Receptor alfa de estrogênio 13.Tamoxifeno 14.Anastrozol

USP/FM/DBD-439/13

À minha incansável companheira Fabiana Silva Okagawa, pelo seu apoio incondicional a minha carreira e sua dedicação à construção da nossa vida a dois.

## **AGRADECIMENTOS**

**À Dra. Mariangela Correa, que muito me influenciou no desenvolvimento do meu senso crítico e me impressionou com sua postura extremamente ética.**

**À Dra. Daniela Filippini Ierardi pela atenção, paciência e apoio durante o processo de realização dos experimentos.**

**À Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis Leon e equipe do Laboratório de Ontogênia e Epigenética da Unifesp, pelo apoio e cortesia.**

**Às pacientes que doaram muito mais que seu tempo e suas histórias para a concretização deste trabalho.**

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 Anneliese 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.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Sobrevida relativa em 10 anos associada com o Estadiamento Do Câncer de Mama da AJCC/UICC (TNM).....	7
Figura 2-	O ciclo da Metionina.....	22
Figura 3-	Exemplo de ensaio de determinação da taxa de metilação global pela técnica de MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme) em duplicata.....	42
Figura 4-	Níveis de Homocisteína (Hcy) em função da idade das pacientes.....	48
Figura 5-	Variações da Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) não se correlacionam com Sobrevida Global (SG)....	52
Figura 6-	Variações dos níveis da Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) se correlacionam com a Sobrevida Livre de Doença (SLD).....	54
Figura 7-	Níveis de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) apresentam maior diminuição após o regime hormonal de curta duração em pacientes com estágio clínico avançado.....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Características clínicas das pacientes.....	44-5
Tabela 2-	Desfechos principais.....	45
Tabela 3-	Braços do regime hormonal neoadjuvante de curta duração e regimes terapêuticos complementares.....	46
Tabela 4-	Dados bioquímicos e moleculares das pacientes.....	47
Tabela 5-	Correlações entre os dados bioquímicos, epigenéticos e variação do tamanho do tumor...	49-50
Tabela 6-	Sobrevida Global (SG) de acordo com variáveis clínicas e patológicas.....	51
Tabela 7-	Tempos médios de Sobrevida Livre de Doença (SLD) estimados segundo categorias de interesse e resultado dos testes comparativos.....	53
Tabela 8-	Análise multivariada da Sobrevida Livre de Doença (SLD).....	55
Tabela 9-	Valores médios de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) de acordo com momento (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) e estadio.....	55
Tabela 10-	Valores médios de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo momentos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) e presença de linfonodos comprometidos.....	56

Tabela 11- Modelos de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo momentos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) e estadiamento clínico ou presença de linfonodo.....	56
Tabela 12- Análises multivariadas de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo estadiamentos clínicos e momentos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante).....	57
Tabela 13- Resultados das comparações múltiplas da Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo presença de linfonodo e momentos da coleta (pré e pós regime hormonal neoadjuvante).....	58
Tabela 14- Descrição das variações na Homocisteína (Hcy), Cisteína (Cy), metilação e tamanho do tumor segundo tratamentos e resultado das comparações.	60



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta$ Cy	Varição de cisteína
$\Delta$ Hcy	Varição de homocisteína
$\Delta$ Tu	Varição do tamanho do tumor
BHMT	Betaina-homocisteína metiltransferase
CBS	Cistationa $\beta$ -sintase
CpGs	Dinucleotídeos de citosina precedendo guanina
Cy	Cisteína
Dnmts	DNA metiltransferases
EC	Estadio clínico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERBB2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
Hcy	Homocisteína
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HpaII	Enzima de restrição sensível à metilação
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
MS	Metionina sintase
MspI	Enzima de restrição
MSRE	<i>Methylation-sensitive restriction enzyme</i>
N0	Tumores sem acometimento de linfonodos
N1	Tumores com comprometimento de um ou mais linfonodos
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SAH	S-Adenosilhomocisteína
SAHH	S-Adenosilhomocisteína hidrolase
SBD-F	7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA para gel de agarose
TCA	Ácido tri-cloro acético
TCEP	Tris-carboxietilfosfina
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TELT	Tampão de lise

## LISTA DE SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
NCDB	<i>National Cancer Data Base</i>
NHSBSP	<i>National Health Service Breast Screening Programme</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science</i>
TNM	Tumor-Linfonodos-Metástase
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

## RESUMO

Raimundo LG. *Homocisteína e cisteína séricas como marcadores epigenéticos de prognóstico e preditivos de resposta em tumores de mamas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O câncer de mama é a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres. Alguns biomarcadores e características clínicas são utilizados para avaliar o prognóstico e prever a resposta a uma série de abordagens terapêuticas. A Homocisteína é conhecida como um fator de risco para doença vascular aterosclerótica, mas sua participação na biologia do câncer ainda é incerta. Cisteína é o aminoácido sulfurado derivado da Homocisteína no ciclo da Metionina. Este ciclo metabólico origina as bases nitrogenadas e também determina o nível de metilação da molécula de DNA. É atualmente reconhecido que a hipometilação global do genoma é um evento chave na transformação maligna das células. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis séricos de homocisteína e cisteína como biomarcadores de sobrevida e de progressão da doença em câncer de mama. Também foi avaliado o efeito de um curso de curta duração (um mês) de tratamento hormonal sobre os níveis de Homocisteína, Cisteína e metilação do DNA. Amostras de sangue foram obtidas por ocasião da biópsia inicial (pré-tratamento) em todas as pacientes e, de tumor e de tecido normal adjacente, ao diagnóstico e em um mês após, para as pacientes que receberam o regime hormonal neo-adjuvante (pré-operatório). Todas as pacientes eram mulheres na pós-menopausa, com tumores de mama ressecáveis, acompanhadas em dois hospitais públicos, que consentiram em participar de outros dois protocolos de pesquisa prévios. Homocisteína e Cisteína foram analisadas por HPLC e a metilação global do DNA do tecido foi determinada por meio da técnica de MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme). Foi observada uma diferença significativa entre os níveis pré e pós-tratamento de Homocisteína e Cisteína em tumores avançados, sugerindo um papel prognóstico em pacientes com características clínicas reservadas. As variações nos níveis de Homocisteína se mostraram significativamente correlacionadas com a sobrevida livre de doença. O modelo de risco proporcional de Cox demonstrou que os níveis de homocisteína e o status dos linfonodos representaram fatores prognósticos independentes em termos de sobrevida livre de doença. Embora mais estudos sejam necessários para confirmar estes resultados, nossa pesquisa sugere que a Homocisteína pode ser usada como um biomarcador de prognóstico para câncer de mama.

Descritores: Oncologia; Neoplasias da mama; Biologia Molecular; Epigênese genética/fisiologia; Repressão epigenética; Metilação de DNA; Prognóstico; Análise de sobrevida; Marcadores biológicos de tumor; Homocisteína; Cisteína; Receptor alfa de estrogênio; Tamoxifeno; Anastrozol

## ABSTRACT

Raimundo LG. *Serum homocysteine and cysteine as epigenetic markers of prognosis and prediction of response in breast tumors* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Breast cancer is the leading cause of cancer mortality among women. Some biomarkers and clinical features are used to evaluate prognosis and to predict response to a range of therapeutic approaches. Homocysteine is well known as a risk factor in atherosclerotic vascular diseases, but its participation in cancer biology is still unclear. Cysteine is a sulfur amino acid derived from Homocysteine in the Methionine cycle. This metabolic cycle originates the nitrogenous bases and determines the methylation level of the DNA molecule as well. It is currently recognized that the global hypomethylation of the genome is a key event in the malign transformation of cells. The aim of this study was to evaluate serum Homocysteine and Cysteine as biomarkers of survival and disease progression in breast tumor, as well as the methylation status of tumor and normal tissues. The effect of a short course (one month) of hormonal treatment on Homocysteine, Cysteine and DNA methylation levels was also evaluated. Blood samples were collected during the initial biopsy (pre-treatment) in all patients and, tumor samples and normal adjacent tissue, at diagnosis and one month after, for the patients that received neo-adjuvant hormonal regimen (pre-treatment). All patients were post-menopausal women, with resectable breast tumors, followed at two public hospitals, and that had consented to participate in two previous research protocols related to their disease. Serum Homocysteine and Cysteine were analyzed by HPLC and tissue global DNA methylation was determined by the MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme) technique. A significant difference was observed between pre- and post-treatment levels of Homocysteine and Cysteine in advanced tumors, suggesting a prognostic role in patients with poor clinical characteristics. Variations in Homocysteine levels were significantly correlated with disease free survival. Cox proportional risk model demonstrated that nodal status and Homocysteine levels were independent prognostic factors for Disease Free Survival. Although more studies are needed to confirm these results, our research suggests that Homocysteine might be used as a prognostic biomarker for breast cancer.

Descriptors: Medical oncology; Breast neoplasms; Molecular biology; Epigenesis, genetics/physiology; Epigenetic repression; DNA methylation; Tumor markers, biological; Survival analysis; Prognosis; Homocysteine; Cysteine; Estrogen receptor alpha; Tamoxifen; Anastrozole

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	04
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
3. 1 Aspectos epidemiológicos do Câncer de Mama.....	05
3. 2 Estadiamento e Fatores Prognósticos do Câncer de Mama.....	05
3.2.1 Receptores de Estrogênio e Prognóstico.....	10
3.2.2 Receptor de Progesterona.....	13
3.2.3 As “assinaturas” de expressão gênica em câncer de mama: uma contribuição do avanço da medicina molecular.....	15
3.3 Homocisteína e seu uso como um marcador biológico.....	17
3.3.1 O Metabolismo da Homocisteína e o Metabolismo do DNA.....	21
3.3.2 Epigenética .....	24
3.3.3 A Metilação e Controle da Expressão Gênica.....	25
3.3.4 Homocisteína, Cisteína e o estresse oxidativo.....	26

3.3.5	Consequências do acúmulo de SAH na regulação epigenética celular e a interação com a Cy na potencialização do dano ao DNA .....	27
3.3.6	Hipometilação e Tumorigênese.....	28
3.4	Câncer de Mama: estratégias terapêuticas.....	28
3.4.1	Radioterapia.....	29
3.4.2	Quimioterapia.....	30
3.4.3	Terapia Hormonal: a primeira terapia-alvo empregada com grande sucesso no tratamento do câncer de mama.....	32
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	37
4.1	Determinação dos níveis sanguíneos de Hcy e Cy .....	39
4.2	Determinação da Taxa de Metilação Global.....	40
4.3	Análise Estatística.....	42
5	RESULTADOS.....	44
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO.....	74
8	REFERÊNCIAS.....	75
	Apêndice	

## 1. INTRODUÇÃO

Até meados do século passado, o câncer de mama era tratado, sobretudo com cirurgias extensas, com pouca evolução em relação à mastectomia introduzida por Halsted no final do século XIX.

Durante anos acreditava-se que a cura do câncer de mama dependia da habilidade do cirurgião e que a doença avançava seguindo uma trajetória anatômica: das mamas para os linfonodos axilares e daí para órgãos à distância.

Posteriormente, houve a compreensão de que o câncer de mama é uma doença sistêmica e que nem todas as pacientes deveriam ser tratadas da mesma maneira. Cirurgias radicais determinavam muito mais morbidade que benefício clínico para uma parcela considerável das pacientes.

O melhor entendimento dos fatores prognósticos, sobretudo os relacionados à extensão da doença primária, levaram a uma sistematização das condutas a serem tomadas diante dos casos da doença. Entre eles, podemos destacar o tamanho do tumor, o número de linfonodos comprometidos e comprometimento de órgãos à distância. Estes fatores consagrados foram a base do sistema de classificação ou estadiamento clínico dos tumores, a partir do qual os médicos começaram a se basear para tomarem suas condutas e as pesquisas clínicas passaram a ser organizadas.

Paralelamente ao emprego de cirurgias mais conservadoras, novas modalidades terapêuticas, adjuvantes ao tratamento definitivo, passaram a ser empregadas. Podemos citar, como exemplos, o tratamento quimioterápico adjuvante (com o objetivo de eliminar as células tumorais circulantes que não estão ao alcance da abordagem cirúrgica) e a radioterapia local (para eliminar pequenos focos da doença que possam ter sobrado no sítio operatório). Ainda em relação ao câncer de mama, outro tratamento adjuvante ganhou destaque por reduzir significativamente as taxas de recidiva da doença e mesmo diminuir consideravelmente a sua mortalidade. Trata-se da terapia hormonal, modalidade na qual drogas que inibem a ação do estrogênio sobre as células mamárias transformadas são empregadas. O Tamoxifeno foi o grande

protagonista desta revolução e foi seguido pelos inibidores de aromatase, que melhoraram, ainda mais, os desfechos clínicos desta doença entre as mulheres na pós-menopausa (a grande maioria dos casos da doença aparece neste período da vida das pacientes).

Diante das várias opções de regimes terapêuticos, os médicos passaram gradualmente a individualizar, cada vez mais, suas decisões diante das pacientes. Boa parte deste processo requer a avaliação de fatores prognósticos e preditivos de resposta terapêutica. Estes fatores são características medidas objetivamente nos tumores ou, até mesmo, nos próprios pacientes. Com relação aos fatores prognósticos, estes predizem a sobrevida livre de doença e sobrevida global independentemente do tratamento. Já os fatores preditivos estão relacionados à resistência ou sensibilidade dos tumores a uma determinada medicação. De uma maneira geral, os fatores prognósticos ajudam na elaboração do plano terapêutico, com a escolha das modalidades a serem empregadas enquanto que os fatores preditivos auxiliam na escolha de um agente terapêutico específico.

Graças à utilização de metodologias moleculares o câncer de mama passou a ser mais bem compreendido enquanto um grupo de doenças relacionadas, mas não homogêneas. A determinação dos perfis moleculares permitiu uma reclassificação dos tumores de mama baseada na diferença de expressão gênica entre estes tipos, com relevância prognóstica. No entanto, os ensaios baseados nestas metodologias ainda não foram testados adequadamente em estudos prospectivos e são inacessíveis à parcela considerável das pacientes, devido ao custo e a complexidade das tecnologias empregadas.

Portanto, ainda existem oportunidades de melhoria na condução das pacientes com câncer de mama, e fatores prognósticos e preditivos, amplamente disponíveis, podem ajudar na tomada de decisão clínica.

Diante deste panorama, nos dispusemos a investigar a relevância de dois biomarcadores cuja determinação encontra-se amplamente acessível nos serviços de saúde: a Homocisteína e a Cisteína. A Homocisteína já é amplamente conhecida como marcador de risco cardiovascular. A Cisteína é derivada da Homocisteína no ciclo da Metionina. A síntese de bases



nitrogenadas e todas as reações de metilação intracelulares, incluindo a metilação do DNA, estão atreladas ao metabolismo destes aminoácidos. A metilação do ácido nucléico é uma das modificações covalentes do DNA e representa um evento epigenético. Alterações no padrão de metilação normal do material genético estão implicadas no processo de gênese tumoral.

Até o momento, poucos estudos investigaram a importância destes marcadores na oncologia. Para cumprir este objetivo, desenvolvemos este estudo observacional a partir de uma coorte de pacientes que tiveram os níveis destes aminoácidos medidos no momento do diagnóstico de câncer de mama, e foram então acompanhadas por um período de tempo considerável. Uma parcela destas pacientes ainda participou de um estudo clínico, comparando anastrozol ao tamoxifeno em um regime neoadjuvante (prévio à cirurgia) de curta duração. Nestas últimas, os níveis destes marcadores foram avaliados novamente no momento da cirurgia e a sua variação pôde também servir de parâmetro. Desta forma, este estudo se propôs a gerar hipóteses sobre o uso da Homocisteína e da Cisteína como marcadores prognósticos e preditivos em câncer de mama.

## 2. OBJETIVOS

Assim, o presente estudo teve como objetivos:

- *Principal*

o Correlacionar a concentração sérica de Hcy e de Cy com os seguintes desfechos clínicos: sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD), sendo o desfecho principal a sobrevida global de acordo com níveis séricos de Hcy.

- *Secundários*

o Correlacionar os níveis séricos destes metabólitos com a taxa global de metilação dos tecidos neoplásicos.

o Correlacionar a Hcy e a Cy como possíveis marcadores de resposta aos diferentes regimes de tratamento empregados.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3. 1 Aspectos epidemiológicos do Câncer de Mama**

Há alguns anos, o relatório da Organização Mundial de Saúde, World Cancer Report 2008, estimou que o câncer de mama seria o câncer mais comum entre as mulheres do mundo todo, com 1,29 milhões de casos. Pela sua alta prevalência, é a neoplasia com a mais alta taxa de mortalidade em mulheres nos países desenvolvidos e a segunda mais alta em países em desenvolvimento.<sup>(1)</sup>

De um total de 260.640 diagnósticos de câncer em mulheres brasileiras, esperados para todo o ano de 2012, mais de 52.000 seriam de mama, de acordo com as estimativas, representando um pouco mais que 20% dos diagnósticos de câncer em nosso país para este sexo. Além desta elevada incidência, uma vez que se trata do segundo tipo de câncer mais diagnosticado no Brasil, do ponto de vista de mortalidade trata-se, também, de um tipo de câncer em destaque. Em 2010, foi responsável por 12.705 óbitos entre as mulheres em todo território nacional.<sup>(2-3)</sup>

#### **3. 2 Estadiamento e Fatores Prognósticos do Câncer de Mama**

Fator prognóstico é definido como qualquer característica do tumor (status dos linfonodos, tamanho do tumor primário, tipo histológico, grau histológico, invasão vascular, etc.) ou do paciente (idade, por exemplo) que apresenta valor preditivo do desfecho clínico do indivíduo acometido pela doença, que é medido em termos de sobrevida específica para câncer ou sobrevida livre de doença.<sup>(4)</sup>

Marcadores prognósticos e preditivos são ambos de alta relevância para a decisão terapêutica e individualização do tratamento, mas eles apresentam significados e papéis distintos. Ambos podem ser derivados de características dos pacientes ou do tipo de tumor. Os fatores prognósticos se prestam a

prever, de maneira objetiva e independente, o desfecho clínico de um paciente a despeito do tratamento. Já os fatores preditivos têm o objetivo de prever a resposta do paciente a uma intervenção terapêutica e estão associados à sensibilidade ou à resistência do tumor aos tratamentos. Fatores prognósticos, necessariamente, necessitam de definição em coortes de pacientes que não se submeteram a tratamento sistêmico adjuvante.<sup>(5)</sup>

Até recentemente, o câncer de mama era tratado como uma única doença mortal para qual o emprego de tratamentos mais extremos era justificável. No final do século XIX, Halsted adaptou uma cirurgia descrita na época renascentista para uma menos extrema, mas ainda muito extensa.<sup>(6)</sup>

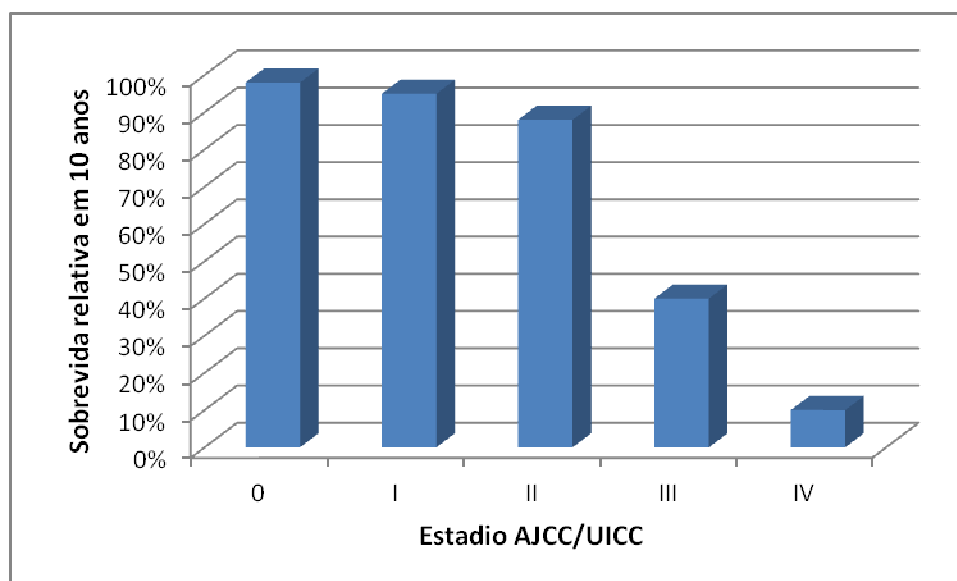
Na primeira metade do século XX, os médicos passaram a perceber que nem todos os cânceres de mama compartilhavam do mesmo prognóstico. Surgiram, então, iniciativas para definir melhor quais as características que, prontamente, poderiam distinguir as pacientes portadoras de tumores que deveriam receber um tratamento mais agressivo.<sup>(7,8)</sup> O Sistema Tumor-Linfonodos-Metástase (TNM) foi desenvolvido por Pierre Denoix, em 1942, e representou uma tentativa de classificar o câncer baseado nos principais atributos morfológicos dos tumores malignos, que eram considerados como os fatores que influenciavam o prognóstico da doença: tamanho do tumor primário (T), presença e extensão do comprometimento de linfonodos regionais (N), e presença de metástases à distância (M). A União Internacional Contra o Câncer (UICC) apresentou classificação clínica do câncer de mama baseado no sistema TNM em 1958, e o Comitê da Junta Americana em Câncer (AJCC) publicou o sistema de estadiamento do câncer de mama baseado no TNM em seu primeiro manual de estadiamento de câncer, em 1977.<sup>(9-10)</sup>

Desde então, revisões regulares são realizadas refletindo os principais avanços no diagnóstico e tratamento. Na revisão de 1987, as diferenças entre a AJCC e a UICC do sistema TNM foram eliminadas.<sup>(11)</sup>

A sexta edição, de 2002, foi utilizada neste trabalho, sendo a sétima, e última, lançada em 2010.<sup>(12)</sup>

Para o médico, o estadiamento estima o prognóstico individual e representa uma informação valiosa para a elaboração da estratégia terapêutica. Bland e colaboradores calcularam a sobrevida em 10 anos de

acordo com o estadiamento TNM para 1,3 milhões de casos registrados na Base Nacional de Dados de Câncer (sigla em inglês NCDB – National Cancer Data Base). Os autores verificaram diferenças significativas entre os estágios: apenas 5% a 12% dos pacientes nos estádios I/II faleceram nos primeiros 10 anos após o diagnóstico, enquanto mais de 60% dos pacientes no estadiamento III e mais de 90% no estadiamento IV faleceram durante este período de acompanhamento.<sup>(13)</sup>



**Figura 1:** Sobrevida relativa em 10 anos associada com o Estadiamento Do Câncer de Mama da AJCC/UICC (TNM). Adaptada de Singletary e Connolly, que se basearam no relato de Bland e colaboradores que utilizaram informações de 1.3 milhões de casos (1985 a 1996) registrados na Base Nacional de Dados de Câncer.

Carter e colaboradores, em 1989, avaliaram o diâmetro inicial dos tumores e o status do comprometimento dos linfonodos à análise patológica, das peças cirúrgicas, de 24.740 casos de câncer de mama. A análise destes casos, a partir destas variáveis, permitiu aos autores observarem que tanto o diâmetro do tumor quanto o comprometimento de linfonodos exerciam efeitos adversos com diferentes intensidades na sobrevida.<sup>(14)</sup>

Observações com esta são universalmente aceitas pela unanimidade observada em vários estudos e acabaram servindo de base para a elaboração e posterior refinamento do estadiamento TNM promulgado em conjunto pela AJCC e UICC.<sup>(14-29)</sup>

Outro fato que chamou a atenção, foi a significativa queda na taxa de sobrevida atribuída ao comprometimento de 4 ou mais linfonodos axilares (21%) e que pode ser evidenciada para todas as categorias ordenadas pelo tamanho do tumor. A sobrevida para mulheres com tumores menores de 2 cm, com nenhum ou de 1 a 3 linfonodos comprometidos, varia de 77 a 99%, ao passo que para mulheres com tumores de mesmo tamanho, mas com 4 ou mais linfonodos comprometidos, a taxa de sobrevida cai para 64%. Outra conclusão foi a de que estes tumores são propensos a se disseminar da mama para sítios distantes, com os linfonodos axilares representando uma espécie de indicador para esta tendência de disseminação. O status dos linfonodos, portanto, permanece como o mais importante indicador prognóstico.<sup>(14)</sup>

Estudos como este validam o sistema de estadiamento TNM como uma ferramenta útil na prática clínica. No entanto, existem outros fatores prognósticos a serem considerados na avaliação individual destas pacientes.<sup>(14,31)</sup>

Certos traços morfológicos estão relacionados ao grau de agressividade tumoral e, a partir da análise sistemática destas características, surgiram as classificações do tumor segundo o grau histológico. O grau histológico também representa um fator prognóstico independente e se correlaciona bem com a sobrevida em 10 anos das pacientes.<sup>(32)</sup> Este consiste em um escore calculado a partir de três características morfológicas do tumor: formação tubular, pleomorfismo nuclear e frequência de mitoses. O resultado final é um valor numérico: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) ou 3 (pouco diferenciado). Aproximadamente metade dos casos de câncer de mama são do grau 3.<sup>(31-33)</sup>

Outros fatores prognósticos têm sido analisados, mas poucos retêm significância como fatores independentes quando avaliados em análises multivariadas.<sup>(34)</sup>

Atualmente, os fatores prognósticos utilizados na rotina clínica para os cânceres de mama operáveis incluem o grau de comprometimento dos linfonodos, tamanho do tumor primário e o grau histológico. Outros fatores, como tipo histológico, invasão vascular e idade, apesar de amplamente citados,

ainda não foram identificados como clinicamente úteis na seleção das pacientes para terapias sistêmicas em geral.<sup>(4,35)</sup>

A esta altura, podemos constatar que o prognóstico é multifatorial e sua melhor discriminação é alcançada com a avaliação integrada de fatores com significância independente comprovada.<sup>(34)</sup>

Um método amplamente utilizado para a análise integrada dos fatores prognósticos relevantes em câncer de mama é o Índice Prognóstico de Nottingham descrito inicialmente em 1982.<sup>(36)</sup> Trata-se de um índice com elevado poder de discriminação, capaz de separar, adequadamente, as pacientes em grupos com diferenças bem nítidas em termos de desfechos clínicos. É aplicável a todos os cânceres operáveis ao diagnóstico clínico (tumores localmente avançados, por serem submetidos a tratamentos pré-operatórios, não são considerados para esta análise uma vez que o tratamento inicial altera os parâmetros utilizados no cálculo do índice), incluindo tumores pequenos detectados em rastreamentos ou em pacientes jovens. Além disto, trata-se de método já validado em estudos prospectivos e multicêntricos internacionais além de ser fácil e barato de ser executado.<sup>(34)</sup>

Em virtude da melhora da sobrevida alcançada com avanços no tratamento das pacientes nas últimas décadas, o índice prognóstico de Nottingham foi atualizado com uma série de casos acompanhados de 1973 a 2000 e com especial atenção para os casos tratados entre 1900 a 1999.<sup>(34)</sup>

O índice é calculado da seguinte forma: Grau Histológico (1, 2 ou 3)+Status Linfonodal (graduado de 1 a 3)+ (Tamanho do maior diâmetro tumoral em cm x 0,2). Tal índice gera um espectro que vai de 2,08 para um tumor de 4 mm, grau 1 e sem comprometimento de linfonodos até 6,9 para um tumor de 4,9 cm, grau 3 e comprometimento de múltiplos linfonodos.<sup>(34-35)</sup>

Atualmente, são reconhecidos 6 grupos: Grupo de Prognóstico Excelente; Grupo de Bom Prognóstico; Grupo de Moderado Prognóstico I; Grupo de Moderado Prognóstico II; Grupo de Prognóstico Ruim; Grupo de Prognóstico Muito Reservado.<sup>(34)</sup>

A sobrevida específica, em dez anos, para os dois grupos de melhor prognóstico são de 96 e 93%, e entre estes dois grupos não houve uma separação significativa nestes estudos, devido ao baixo número de eventos

letais observados. No entanto, para os demais grupos houve uma clara separação em termos de sobrevida, bem ilustrada pelas taxas de sobrevida em 10 anos: para os grupos de moderado prognóstico (I e II) foram observadas as taxas de 81 e 74%, e para os grupos de prognóstico reservado foram observadas as taxas de 50 e 38%.<sup>(34)</sup>

### 3.2.1 Receptores de Estrogênio e Prognóstico

Em meados da década de 1980 e início da década de 1990, estudos com acompanhamento de, pelo menos, 5 anos, e que apresentavam tanto pacientes que não receberam terapia adjuvante sistêmica adicional (quimioterapia complementar à cirurgia) quanto pacientes que receberam tal modalidade, sugeriam um melhor prognóstico das mulheres que apresentavam expressão de receptores hormonais.<sup>(37-41)</sup>

Em 75% dos casos, os tumores de mama expressam receptores hormonais e, na maioria das vezes, o aparecimento e diagnóstico do tumor é evidenciado em mulheres na menopausa.<sup>(42)</sup>

Harvey e colaboradores determinaram os níveis de expressão imunoistoquímica do receptor de estrogênio de 1982 pacientes que se submeteram a diferentes regimes terapêuticos de forma não randomizada (tratamento definitivo foi cirúrgico para todas as pacientes, com 35% das pacientes não recebendo nenhum tratamento adicional, e as mulheres remanescentes receberam somente quimioterapia ou somente terapia endócrina ou, ainda, quimioterapia e terapia endócrina em combinação como regimes adjuvantes) e foram acompanhadas por um período considerável (média de 65 meses).<sup>(43)</sup>

Como não se tratava de um estudo randomizado, e diante de várias opções terapêuticas, a avaliação do valor prognóstico da determinação do status do receptor de estrogênio ficou prejudicada. Tanto para o grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento adjuvante (grupo de baixo risco), como para as pacientes que receberam quimioterapia citotóxica adjuvante (consideradas de alto risco) não houve associação entre o status do receptor e os desfechos avaliados (sobrevida livre de doença e sobrevida geral). Tal fato



se deve, muito provavelmente, à baixa contribuição prognóstica do dado representado pelo status do receptor hormonal. Em compensação, para os dois grupos remanescentes de pacientes (tratadas com a combinação de terapia hormonal e quimioterapia e tratadas apenas com a terapia hormonal adjuvante) a positividade para o receptor hormonal se relacionou significativamente com melhora do tempo para a observação dos desfechos clínicos (maior sobrevida livre de doença e melhor sobrevida geral). O que evidenciou que o status do receptor hormonal tem maior valor preditivo na resposta à terapia hormonal do que propriamente valor como fator prognóstico. Outra contribuição dos autores foi a sugestão de que as pacientes, cujo os tumores apresentem pelo menos 1% de células marcadas com qualquer intensidade à imunoistoquímica, se beneficiam do tratamento hormonal.<sup>(43)</sup>

Barnes e colaboradores, avaliando uma série de 2660 casos tratados na unidade de Mastologia do Guy's Hospital, em Londres, acompanhadas por um período de tempo mais prolongado, também concluíram que, diante de muitos confundidores, o valor prognóstico do receptor de estrogênio fica difícil de ser avaliado. Diante de várias modalidades de tratamento, pacientes com diferentes prognósticos recebem diferentes regimes terapêuticos. Mais uma vez, o valor do status do receptor hormonal deu-se na seleção das pacientes que se beneficiariam da terapia endócrina e, portanto, o seu uso fundamental seria o de fator preditivo de resposta terapêutica.<sup>(44)</sup>

Revisões do status imunoistoquímico do receptor hormonal de tumores de pacientes participantes de estudos clínicos multicêntricos randomizados foram realizados em serviços de patologia de referência centralizados, como observado nos estudos de Regan, Viale e seus colaboradores. Desta forma, houve uma melhor garantia da qualidade dos resultados da imunoistoquímica, como a observação de resultados iniciais falsos. Principalmente, falsos negativos que influenciaram a distribuição das pacientes no período de recrutamento destes estudos, assim como resultados falso positivos que dificultaram a interpretação e a diferenciação entre os diferentes tratamentos. Estas revisões centralizadas demonstraram que a presença de receptor hormonal detectável em, pelo menos, 1% das células tumorais, mesmo que representando uma pequena parcela dos tumores com expressão destes

receptores, apresentavam resposta à endocrinoterapia. Classicamente, os níveis de expressão entre 1 a 10% eram considerados como tumores com baixa expressão de receptor hormonal, mas não necessariamente como positivos para receptores hormonais. Estes mesmos estudos também confirmaram os achados a respeito do valor preditivo de resposta do status do receptor hormonal observados nas revisões de estudos clínicos levadas a cabo em centros individuais, já citados nos parágrafos anteriores. <sup>(45-46)</sup>

O nível de receptores de estrogênio deve ser medido em todos os casos de câncer de mama e a determinação imunoistoquímica é o método de escolha. <sup>(43,47)</sup>

Atualmente, conhecemos dois tipos de receptores de estrogênio. O primeiro tipo foi descrito em 1962 e recebeu, recentemente, a denominação de receptor de estrogênio alfa (RE-alfa) em virtude da descoberta do segundo receptor, batizado de receptor de estrogênio beta. Diante disto, o presente estudo explora apenas o ER-alfa que é o receptor mais extensivamente estudado e com significado clínico já estabelecido. <sup>(48)</sup>

A interpretação dos dados a respeito do status do receptor de estrogênio foi complicada pela falta de consistência nos valores limites escolhidos pelos laboratórios para definição do resultado como positivo ou negativo, ao menos até meados da década de 2000 a 2010. <sup>(47)</sup>

Alguns laboratórios consideravam tumores com receptores de estrogênio detectáveis, porém em baixas concentrações, como negativos, o que pode explicar o fato de que algumas mulheres, com tumores considerados como negativos para receptor de estrogênio, se beneficiaram da terapia antiestrogênica em alguns estudos clínicos. Em 1980, por exemplo, Osborne e colaboradores identificaram que 5 a 10% das mulheres com tumores de mama metastáticos, negativos para receptor de estrogênio, apresentavam resposta ao tratamento com tamoxifeno. <sup>(47,49)</sup> Estes laboratórios incluíam tumores contendo de 10 a 20% das células apresentando receptor de estrogênio entre os designados como receptor de estrogênio negativo. <sup>(45)</sup> Outros autores passaram a sugerir que tumores com níveis muito baixos, porém detectáveis de receptor de estrogênio podem ser considerados positivos, com significado clínico observado em séries de casos. <sup>(43,50)</sup>

Diante disso, a recomendação do programa NHSBSP do Reino Unido é a utilização de pontuação que varia de 0 e de 2 a 8 (conhecida como Allred score) sendo composta pela soma de dois outros escores relacionados à proporção de núcleos corados (0= nenhuma coloração; 1= menos de 1% de núcleos corados; 2= 1 a 10% de núcleos corados; 3= 11 a 33% de núcleos corados; 4= 34 a 66% de núcleos corados; 5= 67 a 100% de núcleos corados) e a intensidade da coloração (0= nenhuma coloração; 1= fraca intensidade; 2= moderada intensidade; 3= forte intensidade).<sup>(31)</sup>

Atualmente, o valor limite para considerarmos um tumor como positivo para a expressão de receptor hormonal é a partir de 1% de células tumorais com marcação (independentemente da intensidade), segundo a pontuação já mencionada anteriormente, simplificando a forma de relatar tal achado.<sup>(48,51)</sup>

### 3.2.2 Receptor de Progesterona

O status do receptor de progesterona (RP) deve ser avaliado e reportado da mesma maneira que o receptor de estrogênio.<sup>(31)</sup>

Do ponto de vista molecular, o receptor de progesterona é um dos produtos finais resultantes da estimulação estrogênica sobre os tecidos alvos, através da interação com o receptor de estrogênio, por isso a existência do receptor de progesterona sugere a expressão do receptor de estrogênio por definição.<sup>(52,53)</sup>

O fenótipo receptor de estrogênio negativo e receptor de progesterona positivo, portanto, não é esperado como um tipo tumoral frequente, e de fato, os autores tem relatado a sua frequência de 2% até 11%, dependendo da população estudada.<sup>(47,53-55)</sup>

Acreditava-se, até recentemente, que parte considerável destes tumores era, de fato, tumores com resultados falso negativos para detecção do receptor de estrogênio, uma vez que apresentavam algum grau de resposta à terapia hormonal.<sup>(47,53)</sup>

Estudos recentes, entretanto, têm provado a existência de tumores expressando receptor de progesterona com insuficiente expressão do receptor de estrogênio por meio da imunistoquímica.<sup>(52)</sup>

Adicionalmente, já existem linhagens celulares bem estabelecidas com este fenótipo, como a Evsa-T.<sup>(56)</sup>

Tumores com a presença de ambos os receptores hormonais são os mais frequentes e não há dúvidas que os fenótipos com a expressão de ambos os receptores e aqueles com ambos os receptores não expressos predizem melhor se haverá resposta a terapia hormonal.<sup>(53)</sup>

Metade das pacientes, cujos tumores apresentam receptor de estrogênio detectável, apresentará remissão objetiva com a terapia hormonal e, quando consideramos pacientes com tumores com ambos os receptores detectáveis, esta taxa se eleva para três quartos, muito provavelmente porque a expressão de ambos os receptores denota que a via de sinalização estrogênica esta intacta, com o receptor de estrogênio funcionando.<sup>(52)</sup>

Neste sentido o receptor de progesterona seria um suposto marcador de um receptor de estrogênio funcional.<sup>(57)</sup>

Com relação à resposta à endocrinoterapia, tumores com a expressão de apenas um tipo de receptor hormonal (receptor de estrogênio ou de progesterona) apresentam taxas de resposta intermediárias à endocrinoterapia quando comparados aos tumores positivos e negativos para ambos os receptores hormonais (RE+/RP+ e RE-/RP-).<sup>(53)</sup> Para tumores localmente avançados e metastáticos, a taxa de resposta à endocrinoterapia em relação àqueles com a expressão apenas de receptor de progesterona (RE-/RP+) é inferior aos tumores com a expressão de ambos os receptores.<sup>(58-59)</sup> Os tumores RE-/RP+ são geralmente considerados para terapia endócrina, mas alguns autores como Yu e colaboradores observaram que pacientes com tumores apresentando este fenótipo ganham menos benefício que as pacientes com tumores RE+/RP+.<sup>(53)</sup>

### 3.2.3 As “assinaturas” de expressão gênica em câncer de mama: uma contribuição do avanço da medicina molecular

Com a utilização da técnica molecular baseada na tecnologia de microarrays de RNA, foi possível determinar uma série de perfis genéticos (baseados em diferenças da expressão gênica) encontrados em neoplasias da mama. Os resultados destes estudos confirmaram que o câncer de mama não é uma doença única com traços morfológicos variados e diferentes marcadores, mas trata-se de um grupo de neoplasias distintas do ponto de vista molecular.<sup>(60)</sup>

Quatro classes moleculares de câncer de mama foram diferenciadas pelo perfil de expressão gênica e constituem a classificação “intrínseca” proposta por Perou e colaboradores: câncer de mama do **tipo Basal** que correspondem a tumores negativos para receptores de estrogênio, progesterona e de HER-2 (por isso, conhecidos como tumores “triplo negativos”); tumores do tipo **Luminal-A**, que são, na sua maioria, positivos para receptor de estrogênio e de baixo grau histológico; tumores **Luminal-B**, que também são, em sua maioria, positivos para receptor de estrogênio, mas podem expressar baixos níveis de receptores hormonais e, frequentemente, apresentam alto grau histológico; e, finalmente, tumores **HER-2** positivos que evidenciam amplificação e alta expressão do gene *ERBB2* e alguns outros genes do amplicon *ERBB2*.<sup>(61-65)</sup>

Estes subgrupos apresentam diferentes prognósticos e respostas terapêuticas. Os tumores luminais A de baixo grau apresentam altas taxas de resposta à terapia antiestrogênica. Os tumores do tipo Luminal B e tumores que apresentam HER-2 e RE positivos, apresentam sensibilidade incompleta à terapia endócrina. Os tumores positivos para HER-2 apresentam uma história natural mais agressiva, porém são sensíveis ao tratamento com Trastuzumab, anticorpo monoclonal contra HER-2. Os tumores do tipo basal também apresentam comportamento mais agressivo, mas apresentam maior sensibilidade à quimioterapia.<sup>(66)</sup>

Embora a obtenção do perfil genético seja considerada o padrão-ouro na classificação deste tipo de tumor, as limitações ao acesso a essas tecnologias

e a necessidade de maior padronização na utilização desta ferramenta taxonômica têm tornado a imunistoquímica uma técnica interessante para ser empregada na rotina, na diferenciação destes tipos de tumor.<sup>(60)</sup>

Estes subtipos correspondem bem à caracterização dos tumores baseada na positividade de RE (acessados pela imunistoquímica) e HER-2 (Imunistoquímica e/ou FISH), assim como marcadores de proliferação ou mesmo grau histológico. Portanto, pouco valor clínico é acrescentado pela determinação do perfil molecular.<sup>(60)</sup>

A determinação molecular dos fenótipos do câncer de mama, no entanto, tem influenciado profundamente os estudos envolvendo esta neoplasia (incluindo estudos clínicos), uma vez que estas diferenças entre os fenótipos podem representar futuros alvos terapêuticos, além de outras contribuições como veremos nos parágrafos seguintes.<sup>(60)</sup>

O conhecimento gerado pela determinação dos perfis genéticos tem sido utilizado para o desenvolvimento de testes genéticos com o potencial de prever melhor os desfechos dos pacientes que os padrões clínicos e patológicos tradicionais.<sup>(60)</sup> Pesquisadores do Instituto de Câncer da Holanda desenvolveram um teste para determinação da assinatura gênica de 70 genes selecionados a partir de uma série de 78 casos que não haviam recebido tratamento adjuvante sistêmico. O ensaio é conhecido como MammaPrint® (Agendia).<sup>(67)</sup>

Este ensaio mede a expressão de 70 genes para classificar as pacientes em dois grupos de risco (bom ou ruim) e foi aprovado pelo FDA para acrescentar informação prognóstica para mulheres com menos de 61 anos, sem comprometimento de linfonodos, com doença em estágio I ou II e com tumor de 5 cm ou menos.<sup>(67-68)</sup>

Outro ensaio molecular, o Oncotype DX® (Genomic Health) mede a expressão de RE e HER-2, assim como transcritos regulados pelo RE e alguns genes relacionados à proliferação celular. O teste é aplicado para pacientes com tumores com RE+, sem comprometimento linfonodal, tratadas com Tamoxifeno. O sistema do ensaio combina estas medidas em um “escore de recorrência” quantitativo, que pode ser utilizado para estimar a probabilidade de

recorrência em 10 anos, categorizando as pacientes em três grupos de risco: baixo, intermediário e alto (com taxas de 7, 14 e 30%, respectivamente).<sup>(60,69)</sup>

Embora muitos autores acreditem que os ensaios moleculares, realmente tenham a capacidade de poupar uma parcela considerável de pacientes com câncer de mama inicial de se submeterem à quimioterapia adjuvante, estes ensaios ainda não foram validados adequadamente em estudos prospectivos que mostrem sua real superioridade diante de preditores clínicos, como o Índice Prognóstico de Nottingham ou o programa “Adjuvant Online”. Além disso, certamente, ainda será necessário maior avanço tecnológico para que ensaios deste tipo estejam mais disponíveis do ponto de vista econômico para se apresentarem como uma medida realmente custo-efetiva na prática clínica.<sup>(71,60)</sup>

### **3.3 Homocisteína e seu uso como um marcador biológico**

Marcadores prognósticos que sejam amplamente disponíveis podem contribuir para o manejo clínico das pacientes de maneira bem efetiva. A Homocisteína (Hcy) têm se mostrado como importante marcador sérico de algumas doenças, nos últimos anos, e o seu potencial como fator prognóstico em oncologia ainda precisa ser mais bem investigado.<sup>(72-73)</sup>

O papel de destaque deste aminoácido na prática clínica teve início em 1969, quando o patologista Kilmer S. McCully avaliava lesões vasculares de crianças que haviam falecido em decorrência de erros inatos do metabolismo. Estas condições cursam com o aumento considerável dos níveis plasmáticos e teciduais de Hcy, e levaram o autor a formular a hipótese de que este aminoácido sulfurado poderia estar envolvido na patogênese da doença vascular aterosclerótica.<sup>(74)</sup>

A partir deste ponto, a preocupação se voltou para os pacientes que apresentavam níveis moderadamente elevados de Hcy em decorrência de polimorfismos genéticos das enzimas envolvidas no seu metabolismo, ou da deficiência nutricional de vitaminas que funcionam como cofatores nestas reações metabólicas e que previnem seu acúmulo no organismo. Embora inúmeros estudos identifiquem uma relação causal entre Hcy e a doença

coronariana, a significância clínica deste achado ainda permanece controversa: estudos caso controle retrospectivos e prospectivos apresentam discrepância. Por exemplo, o “Physicians Health Study”, inicialmente, reportou que os níveis de Hcy acima do percentil 95% estavam relacionados a risco três a quatro vezes maior de evento cardiovascular. O seguimento em longo prazo deste mesmo estudo, no entanto, e mesmo outros estudos mais recentes, mostram pouca ou nenhuma relação entre elevações moderadas de Homocisteína (Hcy) e risco cardiovascular. Estudos prospectivos, com o emprego de tratamento redutor dos níveis plasmáticos de Hcy à base de suplementação de Folato (considerado o principal micronutriente determinante do status da Homocisteína), falharam em demonstrar que esta medida previne eventos cardiovasculares. Além disso, a população americana está submetida à suplementação disseminada de Ácido Fólico, desde a política de suplementação de grãos implementada em 1998 pelo FDA, o que pode ter tornado esta população inadequada para tais estudos. Embora a avaliação dos níveis de Hcy para determinação do risco cardiovascular não seja recomendada na população geral, o estudo deste marcador está indicado para pacientes de baixo risco, segundo os fatores risco tradicionais para doença cardiovascular (obesidade, idade, gênero, história familiar e dislipidemia), mas que tenham apresentado um evento deste tipo.<sup>(75-77)</sup>

A hiperhomocisteinemia também é reconhecida como uma das mais comuns condições associadas à trombogênese, tanto venosa quanto arterial, embora os mecanismos subjacentes a esta relação causal ainda sejam pouco compreendidas.<sup>(78)</sup>

Outros estudos têm investigado o papel da homocisteína como fator de risco para déficit cognitivo e redução da substância branca cerebral, em indivíduos senis saudáveis.<sup>(79)</sup>

A Hcy parece ser também, um marcador de inflamação, uma vez que é possível detectar algum grau de elevação desta em várias doenças inflamatórias crônicas bem conhecidas como, por exemplo, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal e psoríase.<sup>(72,80-81)</sup> Como o processo inflamatório é reconhecido como elemento crítico na patogênese e na progressão de todas as doenças graves e potencialmente letais, podemos averiguar a ocorrência de



hiperhomocisteinemia em pacientes com acidente vascular cerebral, insuficiência renal, doença de Alzheimer e não apenas restrita a pacientes com doença vascular coronariana, já citada anteriormente e considerada, atualmente, como doença inflamatória crônica que cursa com disfunção do endotélio vascular.<sup>(82)</sup>

Com relação às neoplasias, a Hcy chamou a atenção dos pesquisadores por ser um potencial fator de risco e, mesmo, um possível marcador da doença. Chien Feng Sun e colaboradores relataram, no início da década passada, que pacientes com algumas neoplasias, entre elas o câncer de mama, apresentam níveis de Hcy acima do normal. Eles também observaram que a Hcy se correlacionou com a taxa de proliferação das células neoplásicas em cultura. Houve elevação do aminoácido nos sete primeiros dias de cultivo, acompanhando a taxa de proliferação celular. A partir do oitavo dia, no qual as células já haviam atingido a confluência e passaram a morrer, perdendo aderência e flutuando no meio de cultura, os níveis da Hcy passaram a decair, acompanhando a redução das células viáveis.<sup>(83)</sup>

Estudos prospectivos, do tipo caso-controle ou coortes de pacientes dentro de populações maiores pertencentes a outros estudos epidemiológicos (Nurses' Health Study e Women's Health Study) avaliaram não só os níveis plasmáticos da Hcy, mas também das vitaminas cofatores de seu metabolismo. Os autores destes estudos identificaram uma importância significativa do Folato. Em um estudo, pacientes com níveis elevados de Folato tinham menor risco para o desenvolvimento do câncer de mama e tal fato foi mais relevante entre as pacientes com consumo diário de álcool superior a 15 g ao dia. Este estudo já apontava um risco maior de desenvolvimento de câncer para mulheres que consumiam álcool e a suplementação da dieta com as vitaminas parece anular este risco. Muito provavelmente, os efeitos do álcool se devem à perturbação do metabolismo do Folato (figura 2), além da diminuição da sua absorção intestinal. O álcool também diminui a conversão do 5-Metil-Tetrahidrofolato em Tetrahidrofolato, prevenindo a participação do Folato no metabolismo celular, e com esta restrição à sua utilização, menor quantidade de Hcy é remetilada à Metionina e acaba se elevando no plasma. De fato havia

uma tendência à correlação inversa entre os níveis de Hcy e Folato e entre Hcy e vitamina B6.<sup>(73,84)</sup>

Em outro estudo, pacientes com níveis plasmáticos aumentados de Cisteína (Cy) que é produzida a partir da Hcy via reação de transulfuração e, em menor grau, com níveis elevados de Hcy, tinham maior risco de desenvolver câncer de mama, de forma estatisticamente relevante, quando os níveis de Folato plasmáticos estavam baixos.<sup>(84)</sup>

Todavia Alex Gatt e colaboradores observaram que os níveis de Hcy eram maiores, de maneira significativa, entre as mulheres com câncer de mama metastático quando comparadas com mulheres saudáveis e que não estavam em uso de nenhum tipo de medicação. Os autores observaram, também, que a população de pacientes com câncer de mama não metastático apresentavam uma média intermediária para valores de Hcy quando comparadas à população controle e ao grupo de pacientes com doença metastática, embora estas diferenças não representassem significância estatística. Este achado não foi relacionado aos níveis de folato, de maneira significativa, ao se analisarem estes dois parâmetros levando-se em conta seus níveis em pacientes individuais, e os autores especularam, então, que além da deficiência de folato, a própria presença da doença maligna estaria contribuindo para elevação da Homocisteína.<sup>(78)</sup> De fato Jennifer Lin e colaboradores, quando estudavam os níveis de Cy em uma coorte dentro do estudo Women's Health Study, ao excluírem da análise pacientes que tiveram o diagnóstico de câncer de mama em até 2 anos da coleta da amostra de sangue, observaram uma perda de significância estatística entre a relação dos níveis elevados de Cy e o risco para câncer de mama.<sup>(84)</sup>

Os estudos clínicos parecem comprovar é que a Hcy é um marcador sensível da deficiência de Folato. A depleção deste nutriente interfere na conversão de deoxiuridilato em timidilato e leva a uma massiva incorporação da Uracila no DNA, o que pode causar quebras cromossômicas. Além disso, o Folato é o doador universal de grupos Metil para as reações de metilação celulares e a sua deficiência pode levar a uma hipometilação global do genoma, com consequências sérias para a estabilidade e reparo do material

genético. Portanto, todos estes mecanismos contribuem para a instabilidade genética que pode representar o primeiro passo da carcinogênese.<sup>(73)</sup>

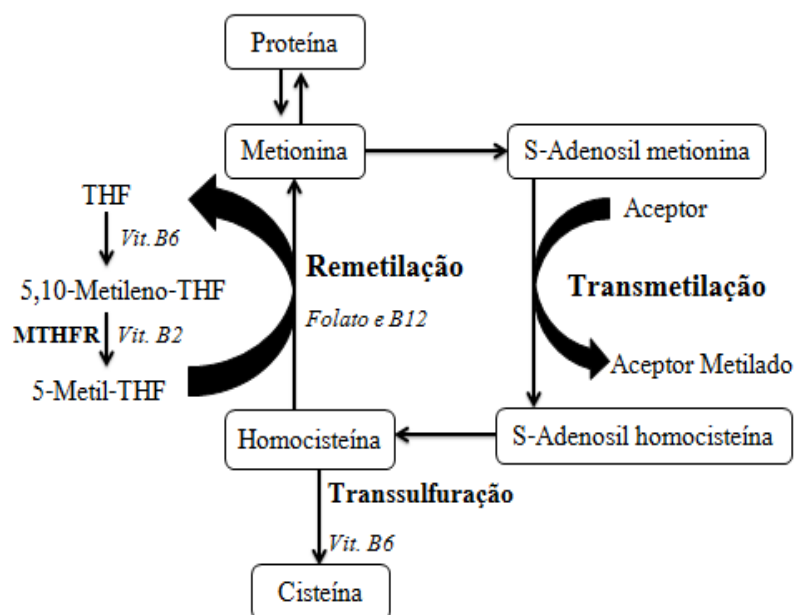
No entanto, uma correlação direta inversa entre os níveis de homocisteína e de Folato dificilmente são estatisticamente significantes nos estudos, tanto no cenário de risco de desenvolvimento como no de doença já estabelecida. As razões possíveis para este fato incluem: a principal forma reduzida na qual o Folato é encontrado no sangue, o 5-Metil-Tetrahidrofolato, pode representar uma forma “aprisionada ou metabolicamente morta” do nutriente, na qual ele não estaria mais sendo utilizado pela célula em decorrência de um processo patológico; a elevação da Hcy é decorrente de perturbações em uma série de reações celulares (como veremos a seguir) que sofrem influência de polimorfismos genéticos das enzimas envolvidas e da necessidade de outros cofatores (vitamina B12 e B6, por exemplo); uma parcela da elevação da homocisteína pode ser devida também à extensão da doença neoplásica em decorrência de um processo multifatorial ainda pouco elucidado.<sup>(76,78,85)</sup>

Em vista dos estudos acima citados, a Homocisteína é um potencial marcador de risco e de atividade da doença.<sup>(73,78,84-85)</sup>

A grande atenção dispensada nos últimos anos à Homocisteína, muito provavelmente, se deve a sua participação no metabolismo dos nutrientes de carbono único, também conhecido como ciclo da Metionina, e seus níveis no plasma são consequência, em última análise, do balanço entre três reações bioquímicas: Remetilação, Transulfuração e Transmetilação.

### 3.3.1 O Metabolismo da Homocisteína e o Metabolismo do DNA

A síntese e a metilação do DNA são demasiadamente dependentes da disponibilidade de nutrientes de um carbono, doadores de grupos metil.<sup>(86)</sup>



**Figura 2:** O ciclo da Metionina. **THF:** Tetrahidrofolato; **MTHFR:** Metilenotetrahidrofolato Redutase. Modificado de Burtis e col.2007.

A Metionina em excesso é degradada em Hcy (Transmetilação). Nesta via, a Metionina funciona como doador de grupo Metil que é utilizado pelas mais variadas Metiltransferases intracelulares na origem de produtos metilados. Neste processo há a formação do SAH (S-Adenosilhomocisteína) que é convertido em Hcy. A Hcy, por sua vez é convertida em Cy por uma via de transsulfuração com reações dependentes da vitamina B6.<sup>(87-88)</sup> No entanto, diante de um balanço negativo da Metionina, a Hcy é remetilada à Metionina em um processo que requer a vitamina B12 como cofator e metiltetraidrofolato como cosubstrato.<sup>(88)</sup>

A única fonte intracelular de Homocisteína (Hcy) é a hidrólise da S-Adenosilhomocisteína (SAH) pela enzima SAH hidrolase (SAHH), a única enzima que metaboliza a Hcy de forma reversível. O outro produto desta hidrólise, juntamente com a Hcy é a Adenosina.<sup>(89-90)</sup>

Metionina sintase (MS ou 5-metiltetraidrofolato-homocisteína S-metiltransferase) e betaina-homocisteína metiltransferase (BHMT) determinam a remetilação da Hcy em Metionina, ambas as reações irreversíveis. A remoção permanente da Hcy do ciclo da metionina pela cistationa  $\beta$ -sintase (CBS), etapa da Transsulfuração que culmina na formação de Cy, também é uma reação unidirecional. O equilíbrio dinâmico da reação da SAHH tende a

favor da síntese de SAH sobre a síntese da Hcy, e a eficiente remoção metabólica da Hcy e da Adenosina permite uma produção sustentada de Hcy de maneira predominante.<sup>(91)</sup>

Neste ponto do ciclo da Metionina, destacamos o papel do Folato, uma forma solúvel de vitamina B que desempenha importante papel na mediação da transferência de fragmentos de carbono único. O Folato está amplamente disponível para os tecidos periféricos em uma de suas formas metiladas e reduzidas, denominada 5-Metil-Tetrahidrofolato que tem alta afinidade pela Metionina sintase, enzima chave da reação de Remetilação, na qual a Hcy recebe o grupo Metil do 5-Metil-Tetrahidrofolato para formar Metionina. Nesta reação, é gerado, também, Tetrahidrofolato, que é substrato na formação de 5,10-Metileno-Tetrahidrofolato de forma dependente da conversão de Serina em Glicina (reação na qual um átomo de carbono da Serina é transferido ao Tetrahidrofolato).

O 5,10-Metileno-Tetrahidrofolato pode, então, doar um carbono para uma molécula de deoxiuridina monofosfato para formar a timidina 5´trifosfato monofosfato (o nucleosídeo de timina que será incorporado à molécula de DNA em formação) e Dihidrofolato (que pode ser reduzido novamente à Tetrahidrofolato). Outra possível reação química seria a oxidação do 5,10-Metileno-Tetrahidrofolato a Formil-Tetrahidrofolato, que é substrato precursor na síntese de novo de purinas. Outro possível destino do 5,10-Metileno-Tetrahidrofolato é ser reduzido, pela enzima Metileno-Tetrahidrofolato Redutase (MTHFR), produzindo novamente 5-Metil-Tetrahidrofolato. Desta forma, uma das reações responsáveis pela remoção adequada da Homocisteína, a Remetilação, está acoplada a reações de conversão entre as formas biodisponíveis do Folato intracelular com a subsequente geração dos substratos moleculares para síntese de material genético (DNA e RNA)<sup>(92-93)</sup>

Distúrbios genéticos ou nutricionais que travam a remoção eficiente da Hcy ou Adenosina induzem a reação inversa da SAHH, determinando acúmulo da SAH.<sup>(94)</sup>

Deficiências nutricionais crônicas (folato, vitamina B-6 e B12) ou mesmo funcionais (como no caso de ingestão crônica de álcool) podem se associar a polimorfismos genéticos ou mutações nas enzimas participantes do

metabolismo do carbono único (por exemplo, polimorfismo da enzima MTHFR), alterando o fluxo dinâmico natural destas reações e determinando o acúmulo de Hcy no interior das células que pode, então, cruzar a membrana celular e se acumular no plasma, atuando como marcador sérico deste processo.<sup>(87)</sup>

A Hcy em excesso é convertida em SAH, que apresenta alta afinidade de ligação à região catalítica da maioria das Metiltransferases dependentes de S-adenosilmetiltransferases, que a torna um potente produto inibidor do processo de metilação intracelular.<sup>(95)</sup>

Por esta razão, a hidrólise contínua do SAH em Hcy e Adenosina é essencial para manter a metilação normal do DNA, RNA, proteína, fosfolipídios, histonas e neurotransmissores, assim como uma multidão de pequenas moléculas essenciais para a função celular normal e sua viabilidade.<sup>(96)</sup>

Com a utilização de método sensível de cromatografia líquida de alta pressão, um estudo conduzido por Cox e colaboradores evidenciou que elevações moderadas na Hcy total do plasma estão altamente relacionadas com elevações paralelas da SAH citoplasmática. Além do mais, aumento dos níveis plasmáticos e linfocitários de SAH também está associado com aumento na hipometilação do DNA. Tal fato sugere que a elevação da Hcy plasmática pode ser um indicador indireto de elevação do SAH intracelular e do comprometimento da capacidade celular de metilação por inibição das DNA (5-citosina) Metiltransferases.<sup>(97-99)</sup>

Uma das consequências funcionais desta reduzida capacidade global de metilação da célula seria a alteração da expressão gênica uma vez que a metilação, uma modificação covalente do DNA, é um dos eventos epigenéticos mais conhecidos.<sup>(88,100-101)</sup>

### 3.3.2 Epigenética

A definição atual de Epigenética foi mencionada primeiramente em 1996 e consiste no “estudo das mudanças de função gênica, herdadas meiótica e/ou mitoticamente, que não podem ser explicadas por mudança na sequência de DNA”<sup>(102)</sup>

Os termos “epigenética” e “modificações epigenéticas” são amplamente citados em estudos com células-tronco, sendo relacionados a diferentes padrões de expressão gênica entre as várias fases do desenvolvimento e entre diferentes órgão e tecidos.<sup>(103)</sup>

Mais recentemente, o estudo dos mecanismos epigenéticos ganhou grande impulso com a descoberta de seu papel no desenvolvimento dos tumores, podendo ter sua importância comparada à das mutações.<sup>(104)</sup>

### 3.3.3 A Metilação e Controle da Expressão Gênica

Existem curtos trechos de DNA ricos em dinucleotídeos CpGs (Citosina precedendo Guanina) denominados de Ilhas de CpGs, que se encontram localizados nas regiões promotoras ou nos primeiros exons dos mais diversos genes.<sup>(104)</sup> O carbono 5´ das citosinas aí situadas está sujeito à metilação por meio de Dnmts (DNA metiltransferases), proteínas responsáveis pela manutenção ou pela origem de um novo padrão de metilação dos genes durante os processos de mitose ou meiose.<sup>(105-112)</sup>

A metilação do DNA, as modificações das histonas e o remodelamento nucleossomal são os três eventos epigenéticos conhecidos genericamente como modificações covalentes do DNA.<sup>(113-119)</sup> Os nucleossomos, formados por duas voltas da dupla fita de DNA ao redor das chamadas “histonas do core” (H2A, H2B, H3 e H4), representam o primeiro nível de compactação da cromatina. Este “cordão de contas” é adicionalmente compactado juntamente com outras histonas e enzimas envolvidas no metabolismo do material genético para formar a cromatina de alta ordem.<sup>(120)</sup> Este microambiente de cromatina é heterogêneo e nele podemos reconhecer diferentes graus de compactação, os quais refletem a concentração e a atividade transcripcional de genes.

Nesse sentido, a eucromatina é uma região que apresenta uma maior concentração de genes e menor grau de compactação em relação à heterocromatina, apresentando maior acesso aos fatores de transcrição e, conseqüentemente, a conformação com maior atividade transcripcional.<sup>(121-122)</sup>

Uma das teorias aceitas é a de que esses processos são desencadeados por uma família de proteínas que se ligam às CpGs metiladas,

às histonas deacetilases, às histonas metiltransferases e aos complexos remodeladores do nucleossomo para determinarem a alteração estrutural da cromatina e, em última análise, o silenciamento do gene.<sup>(113-119)</sup>

### 3.3.4 Homocisteína, Cisteína e o estresse oxidativo

Na circulação sanguínea, a maior parte da Hcy se liga à albumina através de um de seus resíduos de cisteína, formando uma ligação dissulfito. Aproximadamente 10 a 20% da Hcy circulante é representada como uma mistura de dissulfitos com a Cy e com a própria Hcy, ou seja, uma parcela ínfima da Hcy, aproximadamente 1%, circula livre, em sua forma reduzida.<sup>(75,85)</sup>

Uma possível causa importante de lesão endotelial e dano ao DNA seria um aumento na produção de radicais livres de oxigênio gerado durante a oxidação da Hcy. Uma vez que a forma reduzida livre apresenta um grupo sulfidril, radicais livres (inclusive peróxido de hidrogênio) podem ser gerados durante o estabelecimento das ligações dissulfídicas com os grupos sulfidril da albumina, Cy e Hcy. Aparentemente, é o nível plasmático de Hcy reduzida livre que afeta e aumenta o estresse oxidativo. Portanto, as consequências negativas são decorrentes do processo de oxidação da Hcy, que ocorre durante a liberação desta na circulação sanguínea e não da simples presença da Hcy oxidada circulante.<sup>(82,85)</sup>

Cy é um aminoácido precursor de proteínas, Glutathione, Coenzima A e  $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycine.<sup>(123)</sup>

Embora, classicamente, a Cy seja conhecida como um antioxidante devido ao fato de ser o componente limitante da reação que da origem à Glutathione, existem evidências recentes de que a Cy possua ação pro-oxidante que cause dano oxidativo ao DNA como resultado de uma superprodução de radicais livres e peróxido de hidrogênio.<sup>(123-132)</sup>

O Peróxido de Hidrogênio não pode oxidar diretamente o DNA, mas reage rapidamente com metais de transição para formar radicais Hidroxila (OH $\cdot$ ) na chamada reação de Fenton. Os radicais Hidroxila atacam ambas as partes de açúcar e base, levando à fragmentação do açúcar, cisão da fita e à formação de adutores de base, como a 8-hidroxiguanine por exemplo.<sup>(133)</sup>



Estudos *in vitro* com cepas de bactérias sugerem que a Cy funciona como importante agente redutor, sendo, dentre outros agentes, aquele que renova mais eficientemente íons ferrosos (metal de transição) que são consumidos na Reação de Fenton.<sup>(134)</sup>

### 3.3.5 Consequências do acúmulo de SAH na regulação epigenética celular e a interação com a Cy na potencialização do dano ao DNA

Como já mencionado, o acúmulo intracelular de SAH leva à inibição da DNA-metiltransferase, determinando uma hipometilação do DNA. Uma das consequências deste fato é a alteração da expressão de genes específicos, a indução da proliferação celular, alterações da conformação da cromatina e mudanças fenotípicas.<sup>(135-137)</sup>

Em decorrência destas alterações moleculares do DNA, regiões normalmente metiladas podem se tornar não-metiladas, diminuindo a repressão transcricional de proto-oncogenes, promovendo, portanto, a sua ativação gênica.<sup>(138-141)</sup>

Além desta possível diminuição da repressão transicional de proto-oncogenes, temos o fato de que a Hiperhomocisteinemia e o dano oxidativo ao DNA têm sido implicados na patogênese de uma série de doenças, incluindo alguns tipos de câncer. Uma hipótese ainda não explorada seria a de que a hipometilação do DNA mediada pelo SAH poderia aumentar a vulnerabilidade do DNA aos radicais livres, que são prontamente renovados via ação da Cy, demonstrado como um eficiente agente redutor.<sup>(94,134)</sup> Por conta da elevação paralela da SAH e da Hcy, temos um aumento de um agente responsável pela hipometilação do DNA (SAH) e, ao mesmo tempo, do substrato para a formação da Cy (Hcy). Está bem estabelecido que o DNA hipometilado está associado a uma cromatina hiperacetilada e descondensada devido à diminuição da ligação proteínas sensíveis ao grupo metil como as Proteínas Ligadoras ao Metil-CpG e Histonas Deacetilases.<sup>(142)</sup>

A cromatina ficaria menos condensada devido à ação de agentes hipometilantes como o SAH. A conformação mais aberta do DNA é muito mais vulnerável à clivagem por endonucleases e estresse oxidativo, que também

pode determinar cisão da fita do DNA, além da formação dos radicais adutores e, conseqüentemente, de mutações.<sup>(143-147)</sup> De maneira interessante, estudos observacionais têm associado a hiperhomocisteinemia e a deficiência de folato com algumas doenças crônicas próprias do envelhecimento, hipometilação do DNA e aumento de quebras de fita de DNA.<sup>(148,149)</sup> Níveis aumentados de quebra de fita de DNA e, conseqüentemente, apoptose são induzidos por ambos, a Hcy e SAH e estão presentes em células neoplásicas, em doença hepática alcoólica, nas lesões ateroscleróticas e nas células cerebrais de pacientes com Alzheimer.<sup>(148,150-155)</sup>

### 3.3.6 Hipometilação e Tumorigênese

Alterações da metilação do DNA, que influenciam a expressão genética e a integridade do genoma, são um importante componente do desenvolvimento tumoral.<sup>(156)</sup>

Embora a hipometilação localizada e a hipermetilação de genes específicos tenham sido estudadas mais intensivamente, a hipometilação global é uma característica fundamental da maioria dos genomas tumorais, incluindo o câncer de mama. Tem sido proposto que a hipometilação contribua para o desenvolvimento desta doença pela ativação de oncogenes, indução da instabilidade genômica e por causar instabilidade cromossômica.<sup>(157-172)</sup>

## 3.4 Câncer de Mama: estratégias terapêuticas

Em oncologia, os pilares terapêuticos ainda são representados pela cirurgia, quimioterapia e radioterapia.<sup>(1)</sup>

O tratamento primário do câncer de mama pode ser a cirurgia conservadora seguida de irradiação ou a mastectomia seguida ou não de reconstrução mamária. O emprego de terapias sistêmicas adjuvantes tem elevado a sobrevida global das pacientes a partir da eliminação de focos metastáticos distantes do tumor primário. As terapias adjuvantes empregadas no tratamento do câncer de mama incluem a quimioterapia e a terapia hormonal.<sup>(173)</sup>

Adicionalmente a estas estratégias sistêmicas, a radioterapia é usada, em casos selecionados, como um tratamento adjuvante local, com o intuito de destruir as células de câncer de mama que podem permanecer na parede torácica, tecidos adjacentes ou nos linfonodos regionais, após a cirurgia.<sup>(173)</sup>

A cirurgia de Mastectomia Radical, proposta por Halsted no final do século XIX, representou um marco para os pacientes com câncer de mama. Por aproximadamente 80 anos, com apenas poucas modificações, tanto com o aumento de sua extensão para a dissecação e inclusão dos linfonodos mamários internos, como para sua redução para que os músculos mamários fossem poupados (mastectomia radical modificada), a cirurgia proposta por Halsted foi utilizada, praticamente, como havia sido descrita.<sup>(6,174)</sup>

Até primeira metade do século XX, os especialistas acreditavam que o câncer de mama era uma doença que progredia gradualmente a passos anatômicos da mama para os linfonodos e destes para o sangue.<sup>(175)</sup>

Cirurgias extensas continuariam a ser advogadas até que Fisher propôs, no final da década de 60, que o câncer de mama deveria ser tratado com uma doença sistêmica e que cirurgias extensas aumentavam o risco de morbidade, sem melhora apreciável da sobrevida. A partir dos anos 1970, surgiram os primeiros estudos aleatorizados com diferentes propostas cirúrgicas, que representaram um avanço do ponto de vista clínico e oncológico (melhor relação entre morbidade e sobrevida).<sup>(176-177)</sup>

A cirurgia conservadora da mama, i.e., a retirada parcial do tecido mamário e pele, acompanhada de esvaziamento axilar ou mesmo biópsia de linfonodo sentinela, é empregada no tratamento do câncer de mama em estadios iniciais (estadios I e II com tumor de até 4 cm de diâmetro).Atualmente, é o procedimento para tratamento de câncer mamário mais comumente aplicado no mundo.<sup>(174,175)</sup>

### 3.4.1 Radioterapia

Estimativas sugerem que 70 a 83% das pacientes com câncer de mama são submetidas à radioterapia em algum momento durante seu acompanhamento.<sup>(1)</sup>

Clarke e colaboradores, em 2005, concluíram uma meta-análise demonstrando que a radioterapia apresentou redução significativa da recorrência local em 5 anos de acompanhamento e, também, redução na mortalidade específica pelo câncer de mama em 15 anos de seguimento. Em contrapartida, os autores observaram, também, que houve pequeno incremento da mortalidade por doença cardíaca e câncer de pulmão nestas pacientes.<sup>(178)</sup> Darby e colaboradores também observaram que a exposição do coração à radiação ionizante aumenta o risco de doença cardíaca isquêmica.<sup>(179)</sup>

Embora raramente realizada nos dias atuais, a mastectomia radical ainda permanece como uma importante opção terapêutica para o tratamento de câncer de mama, especialmente para os tumores localmente agressivos ou avançados.<sup>(180)</sup>

De acordo com os especialistas do M.D. Anderson Cancer Center, podemos considerar como neoplasias localmente avançadas, os tumores maiores que 5 cm, ou que comprometam a pele ou a parede torácica, ou ainda aqueles que se apresentam com linfonodos axilares fixos ou, ainda, envolvimento dos linfonodos supraclaviculares, infraclaviculares ou mamários internos ipsilaterais. De maneira geral, todos os tumores do estadio III, assim como um subgrupo do estadio IIB (T3N0), são considerados como localmente avançados.<sup>(181)</sup>

Apesar da clara redução da taxa de recidiva local com o emprego da irradiação direta da parede torácica e linfonodos locais após a mastectomia radical e em vista dos seus riscos, apenas recentemente a recomendação formal de radioterapia adjuvante neste cenário clínico foi recomendada pelos autores e especialistas.<sup>(182)</sup>

#### 3.4.2 Quimioterapia

O processo de disseminação tumoral por meio de metástases determinou a necessidade de uma abordagem terapêutica baseado em drogas sistêmicas.<sup>(1)</sup>

Testes empíricos iniciais com cultura de células malignas levaram à utilização das drogas citotóxicas.<sup>(183)</sup> A estreita margem de segurança destas

drogas torna essencial o seu uso de maneira racional. Atualmente, estas drogas são usadas em combinação de diferentes classes, com o intuito de se obter maior eficiência do tratamento com doses menores de cada medicação e, portanto, melhor toleradas pelos pacientes.<sup>(1)</sup>

A quimioterapia adjuvante (pós-operatória) reduz o risco de recidiva e aumenta a taxa de sobrevida entre as pacientes com câncer de mama inicial. A magnitude do benefício, entretanto, é modesta e muitas pacientes têm de ser tratadas para que poucas sejam beneficiadas. Dados do Early Breast Cancer Clinical Trialists' Collaborative Group demonstram que a quimioterapia tem impacto nos tumores que surgem precocemente durante o acompanhamento, com maior benefício observado durante o primeiro ano de seguimento. Diante dos efeitos adversos da quimioterapia citotóxica, o médico atendente deve ponderar uma série de dados prognósticos para selecionar as pacientes que realmente se beneficiariam da quimioterapia adjuvante.<sup>(184,185)</sup>

Para mulheres com câncer de mama localmente avançado, o regime de quimioterapia neoadjuvante (pré-operatório) representou um avanço, pois, anteriormente, boa parte destas pacientes era considerada como portadora de um tumor inoperável. Trata-se de um esquema de terapia sistêmica de indução, administrada anteriormente à terapia local definitiva, que faz com que o tumor diminua ou, eventualmente, se torne indetectável. Esta modalidade terapêutica também pode ser utilizada para evitar o emprego de cirurgias mais extensas.<sup>(186-189)</sup> A maioria dos pacientes apresenta algum grau de resposta à quimioterapia neoadjuvante, sendo que 10 a 20% alcançam resposta clínica completa e 50 a 60% alcançam uma resposta parcial.<sup>(186,188,190-198)</sup>

A resposta clínica não corresponde, necessariamente, à resposta patológica, sendo que, aproximadamente um terço dos pacientes com resposta clínica, apresenta doença residual ao exame anátomo-patológico.<sup>(190-191,193-194)</sup> De maneira geral, a resposta patológica completa é o melhor preditor de sobrevida global e sobrevida livre de doença para as pacientes com câncer de mama localmente avançado que se submetem à quimioterapia neoadjuvante.<sup>(199)</sup>

Kuerer e colaboradores observaram que 12% das pacientes com câncer de mama localmente avançado alcançaram resposta patológica completa à

quimioterapia neoadjuvante e apresentaram taxa de sobrevida significativamente melhor. Entretanto, 13% das pacientes que haviam apresentado resposta completa acabaram apresentando recidiva da doença ou faleceram em até 5 anos.<sup>(200)</sup>

Portanto, marcadores preditivos e prognósticos confiáveis seriam clinicamente importantes para a adequada identificação dos pacientes que se beneficiarão da quimioterapia neoadjuvante, como os que alcançarão resposta patológica completa e ainda permanecerão livres da doença por um longo período de acompanhamento.<sup>(201)</sup>

### 3.4.3 Terapia Hormonal: a primeira terapia-alvo empregada com grande sucesso no tratamento do câncer de mama

O Estrogênio é o principal hormônio envolvido no desenvolvimento e no crescimento das neoplasias mamárias.<sup>(202)</sup> A ooforectomia foi a primeira intervenção que se mostrou eficaz na regressão do câncer de mama avançado, há mais de um século.<sup>(203)</sup> Desde então, a privação de estrogênio têm sido adotada como importante estratégia terapêutica.<sup>(202)</sup>

O Tamoxifeno foi aprovado para o tratamento de mulheres com câncer de mama avançado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1977 e, alguns anos depois, para o tratamento adjuvante deste câncer.<sup>(204)</sup>

Trata-se de um modulador seletivo do receptor de estrogênio (sigla em inglês SERM), pois faz parte de um grupo de drogas que apresentam tanto ação antiestrogênica como estrogênica, na dependência do tipo de organismo e tecido considerado, através de um mecanismo de ação molecular ainda pouco entendido.<sup>(205)</sup> O Tamoxifeno inibe a ligação do estrogênio com seus receptores do tipo alfa de forma competitiva.<sup>(205)</sup> Como consequência, o Tamoxifeno bloqueia a expressão de genes regulados pelo estrogênio, incluindo fatores de crescimento e angiogênicos secretados pelo tumor de forma autócrina ou parácrina. Como resultado, ocorre um bloqueio da fase G1 do ciclo celular determinando a involução tumoral.<sup>(206)</sup> O Tamoxifeno pode, também, induzir, diretamente, a apoptose destas células.<sup>(207)</sup>

O Tamoxifeno reduz o risco de recorrência e prolonga a sobrevida em mulheres com doença restrita à mama e/ou linfonodos axilares, quando o tumor apresenta expressão de receptores hormonais.<sup>(47,208)</sup>

Para mulheres com tumores positivos para o receptor de estrogênio e tratadas por 5 anos com o Tamoxifeno adjuvante, os estudos clínicos evidenciam redução nas taxas anuais de recidiva e de mortalidade da ordem de 50 e 28%, respectivamente. Isto significa que metade das recorrências e mais de um quarto dos eventos letais atribuídos ao câncer são evitados a cada ano de tratamento.<sup>(208)</sup> Este dado se traduz em milhares de vidas salvas anualmente e, certamente, contribuiu para queda da mortalidade atribuída ao câncer de mama ao longo da década de 90. Tais dados delineiam uma história de sucesso dentro da oncologia.<sup>(209)</sup>

Devido a sua ação diferencial nos diversos tecidos, o uso de Tamoxifeno resulta em benefícios adicionais aos pacientes: proteção para doença cardiovascular aterosclerótica e aumento da densidade óssea. Não obstante, as pacientes podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis como sintomas característicos da menopausa, tromboembolismo, além de ser uma droga com potencial de induzir a proliferação do tecido endometrial.<sup>(47,210-215)</sup>

Apesar dos benefícios evidentes, o sucesso do Tamoxifeno é parcial, pois podemos observar que a metade das mulheres tratadas com este medicamento apresenta recidiva da doença ao longo do acompanhamento.<sup>(209,216)</sup>

Tal fato, contudo, não impediu que o Tamoxifeno fosse considerado o tratamento hormonal padrão para o câncer de mama, até que uma classe de drogas, conhecidas como Inibidores da Aromatase, passasse a complementar o Tamoxifeno no tratamento de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama positivo para receptor de estrogênio.<sup>(209)</sup>

O nível residual, porém estável, de estrogênio encontrado durante a menopausa é resultado da atividade da aromatase periférica, que é encontrada em uma série de tecidos não glandulares (cérebro, fígado, músculo, tecido mamário normal, e gordura subcutânea) e, também, no tecido neoplásico mamário, sendo este último o principal compartimento responsável pelos níveis séricos de estrogênio nas pacientes.<sup>(217-219)</sup>

Em mulheres após a menopausa, o nível deste hormônio no tecido tumoral mamário é 10 vezes maior que no plasma, muito provavelmente, em parte devido a presença de aromatase no tecido tumoral.<sup>(220)</sup>

O uso investigacional dos inibidores da aromatase em mulheres na pré-menopausa tem sido mínimo, pois um dos efeitos do uso destas drogas é a diminuição do feedback negativo de estrogênio sobre o hipotálamo e pituitária, provocando aumento dos ovários em alguns modelos animais.<sup>(221)</sup>

O Aminoglutetimide foi a primeira droga utilizada na supressão de hormônios esteroidais da adrenal (“adrenalectomia medicamentosa”), para o tratamento do câncer de mama avançado. Devido a seus efeitos colaterais, esta medicação passou a ser contra-indicada. Com a descoberta, no entanto, de que sua efetividade era proveniente de sua ação inibidora da enzima aromatase, houve um esforço ao longo da década de 1980 e início dos anos 1990 para o desenvolvimento de novas drogas com tal efeito. Hoje, nós as conhecemos de acordo com a ordem cronológica em que foram clinicamente desenvolvidas (primeira, segunda ou terceira geração) e de acordo com seu mecanismo de ação (tipo 1 e 2).<sup>(209,222-225)</sup>

Os inibidores do tipo 1 são análogos esteroidais da androstenediona e se ligam de maneira irreversível à molécula de aromatase. Os inibidores do tipo 2 ou não-esteroidais se ligam de maneira reversível ao grupo heme da enzima.<sup>(209)</sup>

Atualmente, pela sua maior eficácia farmacológica e maior especificidade pelo alvo molecular, são os inibidores de aromatase de terceira geração que são recomendados para o tratamento clínico desta neoplasia.<sup>(209)</sup>

De maneira geral, tanto o tamoxifeno quanto os inibidores da aromatase de terceira geração, constituem um grupo de drogas bem toleradas pelos pacientes devido à alta especificidade de suas ações. Alguns efeitos colaterais, de ambas as classes, dividem a mesma natureza, como ondas de calor e vagina seca. Por outro lado, os inibidores de aromatase estão associados a um maior risco de fraturas, pois a supressão de estrogênio aumenta os níveis de absorção óssea.<sup>(226-230)</sup>

De maneira geral, para mulheres na pós-menopausa com tumores com receptores hormonais positivos, os estudos clínicos têm apontado para uma



superioridade dos inibidores de aromatase, nos diversos cenários clínicos no que diz respeito a alguns desfechos clínicos como: resposta tumoral, tempo para progressão da doença e sobrevida livre de doença. Em termos de sobrevida global, os estudos ainda não conseguiram demonstrar superioridade absoluta dos inibidores de aromatase, mas as informações geradas até o momento sustentam a utilização preferencial destas drogas.<sup>(216,231-232)</sup>

O tratamento com o objetivo de modular a atividade do receptor de estrogênio foi, provavelmente, o primeiro tratamento que poderia ser chamado de “terapia alvo”, que se destina a inibir um fator especificamente envolvido na tumorigênese do câncer de mama. Mas esta abordagem não é a única terapia específica disponível para o tratamento desta neoplasia.<sup>(233)</sup>

Nos últimos anos, foi identificada uma série de vias moleculares envolvidas na tumorigênese mamária.<sup>(234)</sup> Este conhecimento tornou possível o desenvolvimento de terapias anticâncer direcionadas contra estes alvos moleculares e que apresentam poucos efeitos adversos comparados aos agentes citotóxicos. Um exemplo é o Trastuzumab (Herceptin; Genentech, South San Francisco, CA) um anticorpo monoclonal humanizado que se liga com alta afinidade ao domínio extracelular do receptor transmembrana HER-2, e têm sido empregado no tratamento de tumores de mama com alta expressão deste receptor, com melhora significativa (cerca de 50%) na sobrevida destas pacientes.<sup>(235)</sup>

Frente ao exposto, é possível compreender que o câncer de mama não é mais considerado como uma doença única, mas sim uma coleção de doenças neoplásicas distintas do ponto de vista molecular e clínico. Uma vez que diferentes doenças se originam de diferentes tipos celulares, diferentes contextos moleculares podem estar presentes. As maiores diferenças moleculares e clínicas são encontradas entre os cânceres de mama ER positivos e negativos e autores como Puztai têm demonstrado, por exemplo, que a maquinaria celular destes tumores difere na expressão de milhares de genes.<sup>(60-63,236)</sup> Estudos que não levam em conta tais diferenças podem incorrer em resultados inconclusivos.

Atualmente, não existem estudos explorando os níveis séricos de metabólitos envolvidos no ciclo dos nutrientes de carbono único como

marcadores de desfecho clínico em câncer de mama e, tal fato, é ainda mais verdadeiro se levarmos em conta o câncer de mama ER positivo. Como vimos, os níveis séricos da Hcy e a Cy podem refletir alterações na homeostasia epigenética da célula, através de modificações da taxa de metilação dos genes envolvidos na regulação do ciclo e diferenciação celulares ou mesmo morte celular programada.

Fatores metabólicos, além de serem relacionados ao risco de desenvolvimento do câncer de mama segundo alguns autores, sobretudo tumores RE+, podem ter significado prognóstico por interferirem nos mecanismos epigenéticos.<sup>(73,84)</sup> Estes constituem em fator de singularidade tumoral com relação ao nível de expressão de diferentes genes envolvidos na contribuição da diversidade de comportamento deste tipo de câncer.<sup>(94,237-238)</sup>

A Hcy e a Cy representam analitos cuja aferição é realizada por metodologias já amplamente disponíveis e acessíveis aos clínicos, e se a sua determinação tiver significado prognóstico e preditivo, pode contribuir de forma significativa na tomada de decisão individualizada na prática clínica, frente a uma paciente com neoplasia de mama.<sup>(239-240)</sup>

#### 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, em que as informações clínicas e dados relevantes foram recuperados dos prontuários físicos das pacientes participantes, provenientes dos arquivos de duas instituições: Hospital São Paulo e Hospital Pérola Byington-SP, Brasil.

Noventa e sete pacientes foram recrutadas nos ambulatórios especializados destes dois serviços.

Estas pacientes foram inicialmente estudadas em dois protocolos de estudos, sendo as 30 primeiras participantes do projeto “Correlação entre dieta e os níveis globais de metilação do DNA em carcinomas de mama” (Germano PBMR, Gebrim LH, Jasiulionis MG, Correa M, e col.) protocolo nº 1160/04 aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital São Paulo; e as 67 seguintes incluídas no estudo de acordo com o protocolo 0904/4, aprovado no mesmo Comitê de Ética e Pesquisa e que rendeu a publicação “Short-term anastrozole therapy reduces Ki-67 and progesterone receptor expression in invasive breast cancer: a prospective, placebo-controlled, double-blind trial.” J. Cancer Res. clin. Oncol. 01 outubro 2010.

Apesar de diferenças de protocolos entre os dois estudos, todas as pacientes apresentavam critérios de inclusão em comum: todas se encontravam na menopausa e apresentavam tumores ressecáveis (estádios I, II e III). A ausência de expressão para receptores hormonais não foi considerada critério de exclusão, e tais pacientes poderiam se submeter a ambos os protocolos. Apenas pacientes com carcinoma de mama invasivo poderiam ser incluídas.

Todas as pacientes foram submetidas à biópsia diagnóstica. As amostras de tecidos, obtidas por biópsia excisional neste momento, foram denominadas como iniciais ou pré-tratamento.

As 30 pacientes iniciais foram submetidas a diferentes regimes terapêuticos, em concordância com seu estágio clínico, sendo acompanhadas prospectivamente após prévio consentimento (TCLE aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do hospital São Paulo - Universidade Federal de São Paulo,

anexo 1) . Amostras de soro e plasma foram coletadas imediatamente antes ou após a biópsia inicial, e armazenadas a -20° C até o momento da análise.

As 67 pacientes restantes, todas também no período pós-menopausa, após terem conhecimento do estudo e concordarem em participar do mesmo assinando o Termo de Consentimento previamente aprovado pelo mesmo Comitê de Ética e Pesquisa (anexo 2), foram submetidas a esquema neoadjuvante, com a duração de quatro semanas, em três grupos (placebo ou tamoxifeno 20 mg ou anastrozol 1 mg), seguido ou não de tratamento adjuvante de acordo com critérios clínicos determinados pelo médico que realizou o acompanhamento. O período de tratamento neoadjuvante de 4 semanas foi escolhido pois trata-se do intervalo de tempo médio necessário para a conclusão dos testes de rotina pré-operatórios nos dois serviços onde as pacientes foram recrutadas, justificando o uso de placebo sem consequências clínicas adversas para as pacientes. Para estas pacientes, amostras de soro e plasma também foram obtidas no pré ou pós-operatório imediatos e armazenadas a -20°C até o momento da análise.

Amostras de tumor também foram obtidas a partir da cirurgia definitiva, representando as amostras finais ou pós-tratamento neoadjuvante.

Informações clínicas e histológicas foram obtidas dos prontuários das pacientes. Por ocasião do diagnóstico e tratamento das pacientes arroladas em nosso estudo, a referência de estadiamento foi a sexta edição do manual revisada e lançada em 2002.<sup>(241)</sup> Entre os parâmetros clínicos observados, temos o tamanho do tumor (T), acometimento de linfonodos (N0, sem acometimento de linfonodos e N1; comprometimento de um ou mais linfonodos em qualquer cadeia), estadio clínico (EC, estadios iniciais= I e II; Estadio avançado= III), recidiva local, recidiva a distância, data do último evento (recidiva, morte ou última visita ao ambulatório) e a causa da morte (evento fatal devido ao tumor ou não). O tamanho inicial do tumor foi definido por exame clínico ou por exame de ultrassonografia, aquele que apresentasse o maior valor. O tamanho final do tumor foi definido por exame histológico da peça cirúrgica.

A determinação do status dos receptores hormonais foi realizada por imunohistoquímica e as pacientes que participaram do estudo randomizado para

endocrinoterapia neoadjuvante tiveram o status dos receptores hormonais de suas amostras posteriormente revisados por dois patologistas segundo a pontuação de Allred, considerando o limite de 2 (amostras tumorais contendo pelo menos 1% das células marcadas em qualquer intensidade foram consideradas como positivas para expressão dos receptores hormonais: RE e/ou RP).

Todas as 97 pacientes foram acompanhadas por períodos que variaram de 4 a 7 anos (média: 5,58; mediana: 5,6).

#### **4.1 Determinação dos níveis sanguíneos de Hcy e Cy**

As amostras de sangue foram coletadas pelas Equipes de Enfermagem da Casa da Mastologia da Unifesp-EPM ou do Hospital Pérola Byington, por punção venosa, juntamente com os outros exames solicitados pelo corpo clínico e foram transportadas para o laboratório da Disciplina de Imunologia da Unifesp-EPM em isopor com gelo. Foram imediatamente centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O soro e o plasma foram aliquotados em dois (2) eppendorfs cada e congelados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A dosagem das concentrações de Hcy e Cy no plasma das pacientes foi realizada a partir do método de Pfeiffer e colaboradores e adaptado por Nunes e colaboradores para aplicação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – *high performance liquid chromatography*) com detecção fluorimétrica e eluição isocrática.<sup>(239,240)</sup>

Descrevendo brevemente, o método consiste na separação do plasma através do uso de anticoagulante EDTA na coleta do sangue e posterior centrifugação. O plasma é tratado com agente redutor tris-carboxietilfosfina (TCEP) para separação da homocistina em duas moléculas de Hcy e daquelas ligadas a proteínas plasmáticas, permitindo a quantificação da Hcy total. Após a interrupção da reação e precipitação das proteínas com ácido tri-cloro acético (TCA), centrifuga-se novamente para separação das proteínas. O sobrenadante é transferido para outro recipiente para reagir com o agente 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonato (SBD-F), específico para marcação

fluorescente do átomo de enxofre. Após incubação, o produto é injetado em um HPLC utilizando coluna de fase reversa, ocorrendo a detecção em cerca de 7 minutos. A detecção da fluorescência dos compostos separados é feita com detector ajustado para excitação 385nm e emissão 515nm.<sup>(239,240)</sup>

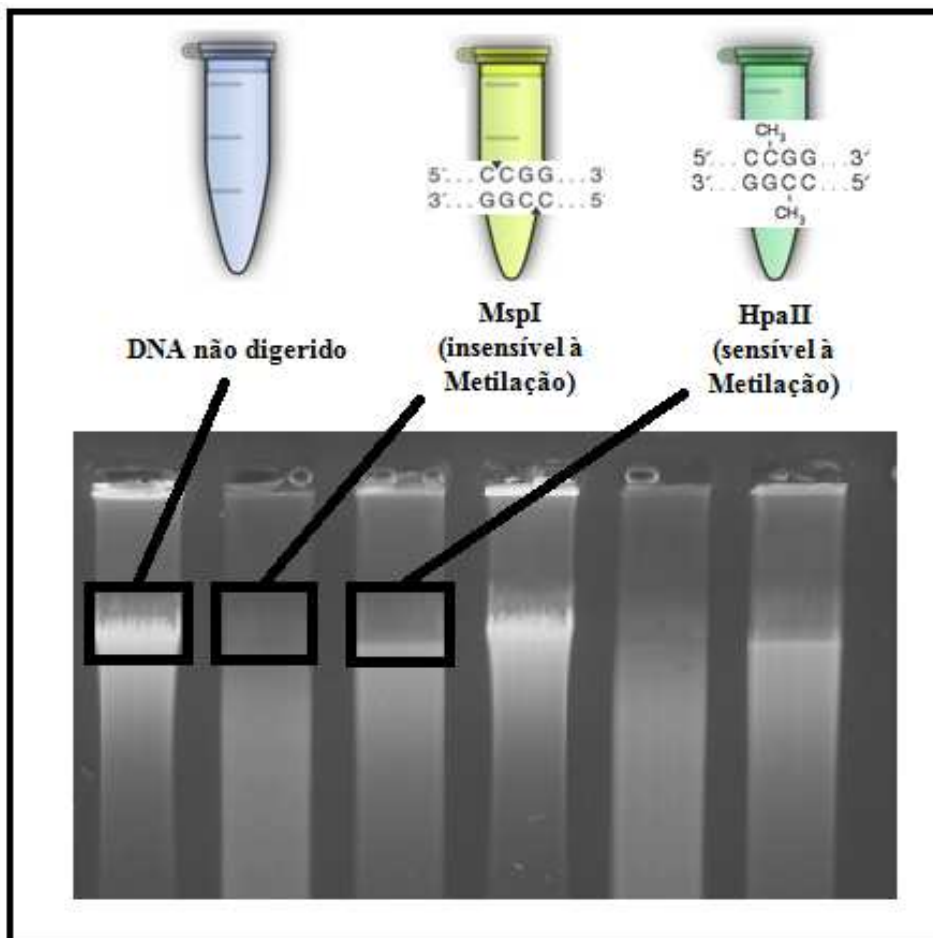
$\Delta Hcy$  (ou  $\Delta Cy$ ) positiva ou negativa foram definidas como o valor da Hcy no pós-tratamento (ou Cy) menos o valor da Hcy (ou Cy) pré-tratamento.

#### **4.2 Determinação da Taxa de Metilação Global**

Tecido tumoral e tecido de mama normal adjacente, obtidos à biópsia diagnóstica e na peça cirúrgica, foram submetidos à extração de DNA. Os fragmentos coletados foram picotados em pequenos cortes e colocados em 1000  $\mu$ L do tampão de lise TELT (100 mM Tris HCl, pH 8,5; EDTA 5 mM; 0,2% SDS e 200 mM NaCl). Essa solução foi agitada por inversão durante 5 minutos e, 5 $\mu$ L de Proteinase K 20 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foram adicionados. Os fragmentos foram incubados por aproximadamente 16 horas a 55°C. Após este período o homogeneizado é subdividido em 2 tubos e a cada tubo são adicionados 500 $\mu$ L de fenol saturado em Tris 0,1M pH 8.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A solução é então agitada por 5 minutos e centrifugada 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa superior é transferida para novo tubo onde são adicionados 500 $\mu$ L de fenol saturado em Tris 0,1M pH 8.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A solução é agitada por 5 minutos e centrifugada 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para tubos limpos, onde foram adicionados 500 $\mu$ L de clorofórmio (Merck) e a solução deve então ser homogeneizada por inversão durante 3 minutos. Os tubos são centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A fase superior é transferida para novo tubo e o procedimento repetido. A fase aquosa resultante é transferida para novo tubo e então adicionado 1 ml de etanol absoluto gelado e o DNA é submetido a precipitação a -20°C por 30 minutos. Os tubos são então centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos, a 4°C, e o sobrenadante descartado. O precipitado é posteriormente lavado em 1 ml de etanol 70% e centrifugados a 14.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O

sobrenadante é então descartado e o DNA mantido durante aproximadamente 15 minutos em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, o DNA é ressuspenso em água Milli-Q autoclavada e incubado por 15 minutos a 37°C para sua completa solubilização. A dosagem do DNA genômico extraído dos diferentes fragmentos foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) e sua integridade demonstrada em eletroforese em gel de agarose 0.8%, preparado em tampão TBE.

O DNA obtido foi submetido a ensaio de determinação da taxa de metilação global pela técnica de MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme) em triplicata. Dois microgramas de cada amostra de DNA extraído foram digeridos separadamente com 2 µL das enzimas de restrição MspI e HpaII (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) por aproximadamente 16 horas a 37°C. Após este período, adiciona-se mais 1 µL de cada enzima e os DNAs são digeridos por mais 1 hora a 37°C. DNAs sem digerir (controle) e digeridos foram visualizados em gel de agarose 0,8% e as imagens obtidas através do programa ImageQuant (GE Lifescience). A densitometria das bandas resultantes foi realizada através do programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Posteriormente, foi calculada a porcentagem de metilação de cada amostra, tratada ou não, subtraindo-se a banda resultante da digestão com MspI da HpaII e dividindo-se pela banda sem digerir (HpaII-MspI/DNA não digerido).



**Figura 3:** Exemplo de ensaio de determinação da taxa de metilação global pela técnica de MSRE (Methylation-Sensitive Restriction Enzyme) em duplicata. A porcentagem de metilação de cada amostra é obtida subtraindo-se a banda resultante da digestão com MspI da HpaII e dividindo-se pela banda sem digerir (HpaII-MspI/DNA não digerido).

### 4.3 Análise Estatística

O teste Kruskal-Wallis foi usado para comparar Hcy, Cys e valores do tamanho do tumor, e estas variáveis foram correlacionadas usando o teste de correlação de Spearman quando adequado.<sup>(242)</sup> O teste de  $\chi^2$  de Pearson foi utilizado para comparar as proporções dos tratamentos pós-operatórios entre as pacientes do primeiro estudo e as do segundo.

Sobrevida livre de doença (SLD) foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data da primeira recidiva ou da morte, e apresentada utilizando-se o método de Kaplan-Meier.<sup>(243)</sup> O período de seguimento foi determinado da data de diagnóstico até a data da última consulta ambulatorial



ou data da morte. As curvas de sobrevida foram comparadas utilizando-se o teste de Log-rank ou de Breslow quando observada alguma intersecção das curvas. Análise univariada e multivariada foram realizadas pelo método de regressão de Cox.

Análises multivariadas testaram todas as variáveis encontradas na análise univariada com um valor de p inferior a 0,05, e as pacientes com dados incompletos foram excluídas. Todos os testes estatísticos foram bi-caudados, e o nível de significância estabelecido em 5%. As análises foram feitas utilizando o programa Statistical Package for Social Science SPSS (release 15.0, Chicago, Illinois, USA). As análises estavam de acordo com as recomendações de estudos para marcadores prognósticos.<sup>(5)</sup>

## 5. RESULTADOS

As informações clínicas iniciais acerca das pacientes se encontram resumidas na tabela 01 e na tabela 02 temos os desfechos clínicos principais. Podemos notar que a média do tamanho do tumor ao diagnóstico foi de apenas pouco mais de 4 cm, no entanto, aproximadamente 40% das pacientes apresentaram comprometimento de, ao menos, um linfonodo na apresentação inicial.

**Tabela 01:** Características clínicas das pacientes.

Característica	Média/Mediana	n(%)
<b>Idade</b>	65.90/66.5	88
<b>T (Tamanho do tumor)</b>		
1		2 (2%)
2		67 (69.%)
3		7 (7%)
4		14 (14%)
Desconhecido		7 (7%)
<b>N (comprometimento linfonodal)</b>		
Sim		40 (41%)
Não		52 (54%)
Desconhecido		5 (5%)
<b>Estadio Clínico</b>		
I ou IIA ou IIB		68 (70%)
IIIA ou IIIB		20 (21%)
Desconhecido		9 (9%)
<b>Receptor de Estrogênio Alfa (Tumor RE+)</b>		
Sim		58 (60%)
Não		27 (23%)
Desconhecido		12 (12%)
<b>Receptor de Progesterona (Tumor RP+)</b>		
Sim		40 (41%)
Não		35 (36%)
Desconhecido		22 (23%)

**Receptor Hormonal\***

Sim	62(64%)
Não	19(20%)
Desconhecido	16(16%)

\*pacientes com tumor com expressão de ao menos um dos receptores hormonais; n: número de pacientes; RE: receptor de estrogênio alfa; RP: receptor de progesterona.

Chama a atenção o número muito baixo de óbitos nesta população, apenas 9 pacientes faleceram em decorrência do câncer de mama, ao longo do acompanhamento.

Com relação à resposta ao regime hormonal neoadjuvante de curta duração, uma paciente pertencente ao braço de tratamento do anastrozol apresentou um tumor residual de menos de 1mm à cirurgia definitiva.

**Tabela 2:** Desfechos principais.

<b>Evento</b>	<b>Média/Mediana</b>	<b>n(%)</b>
<b>Recidiva Local</b>		
Sim		6 (6%)
Não		75 (77%)
Desconhecido		16 (17%)
<b>Recidiva a Distância</b>		
Sim		21 (22%)
Não		59 (61%)
Desconhecido		17 (18%)
<b>Sobrevida</b>		
Vivas		71 (73%)
Morte por Câncer		9 (9%)
Morte por outras causas		2 (2%)
Desconhecido		15 (15%)
<b>Tamanho Inicial do Tumor (cm)</b>	4,26/4,0	94
<b>Tamanho Final do Tumor (cm)</b>	3,05/3,0	76
<b>ΔTU (cm) (Inicial - Final)</b>	1,13/1,0	75

n: número de pacientes; ΔTU: diferença no tamanho do tumor ao diagnóstico e após a cirurgia (cm).

Na tabela 03 estão descritos os regimes terapêuticos adotados para todas as pacientes.

Sessenta e seis pacientes foram aleatoriamente selecionadas para comporem três braços possíveis, com a utilização da droga por 4 semanas, antes da cirurgia definitiva: placebo, anastrozol e tamoxifeno. Estas opções compõem o chamado regime hormonal neoadjuvante de curta duração.

Cada paciente poderia receber até 4 regimes complementares à cirurgia definitiva: regime hormonal de curta duração ou quimioterapia sistêmica como regimes neoadjuvantes, radioterapia loco-regional, quimioterapia sistêmica e/ou hormonioterapia adjuvantes.

As cirurgias inicialmente planejadas (de acordo com as diretrizes adotadas pela Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia e pela Sociedade Brasileira de Mastologia, vigentes na época) não sofreram nenhuma mudança a despeito do nível de resposta ao regime hormonal neoadjuvante de curta duração, ou seja, o planejamento cirúrgico seguiu a indicação pelas características clínicas iniciais (estadiamento clínico) e não sofreu nenhuma alteração independentemente do grau de resposta alcançada.

**Tabela 3:** braços do regime hormonal neoadjuvante de curta duração e regimes terapêuticos complementares.

<b>t= 66*</b>	
<b>Randomização e Modalidades Terapêuticas</b>	
Placebo pré-operatório	12 (12,3%)
Anastrozol pré-operatório	24 (24,7%)
Tamoxifeno pré-operatório	30 (30,9%)
<b>Modalidades Cirúrgicas Empregadas</b>	
<b>t= 97</b>	
Mastectomia Radical Modificada	69 (71,1%)
Quadrantectomia (Cirurgia Conservadora da Mama)	13 (13,4%)
<b>Dados incompletos</b>	<b>15 (15,5%)</b>
<b>Tratamentos Adjuvantes**</b>	
<b>t= 97</b>	
Radioterapia loco regional	50 (51,5%)
Quimioterapia Citotóxica Adjuvante	47 (48,4%)
Terapia Hormonal Adjuvante***	43 (44,3%)
Dados incompletos	33 (34,0%)

\*uma paciente inicialmente recrutada teve indicação de receber quimioterapia citotóxica pré-operatória e foi desligada do estudo clínico do regime hormonal de curta duração; \*\*cada paciente poderia receber uma combinação de até três modalidades de tratamento adjuvante (radioterapia, quimioterapia citotóxica e terapia hormonal); \*\*\*terapia com o emprego de Tamoxifeno ou Anastrozol, por 5 anos, após a cirurgia definitiva; t: total de pacientes.

Na tabela 04 encontram-se representadas os dados bioquímicos e moleculares das pacientes.

Os níveis de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) foram mensurados no momento da biópsia inicial em todas as pacientes. Pacientes que não participaram da randomização e não receberam regime hormonal de curta duração pré-operatório não tiveram medida de Hcy e Cy realizadas no momento da cirurgia definitiva.

**Tabela 4:** dados bioquímicos e moleculares das pacientes.

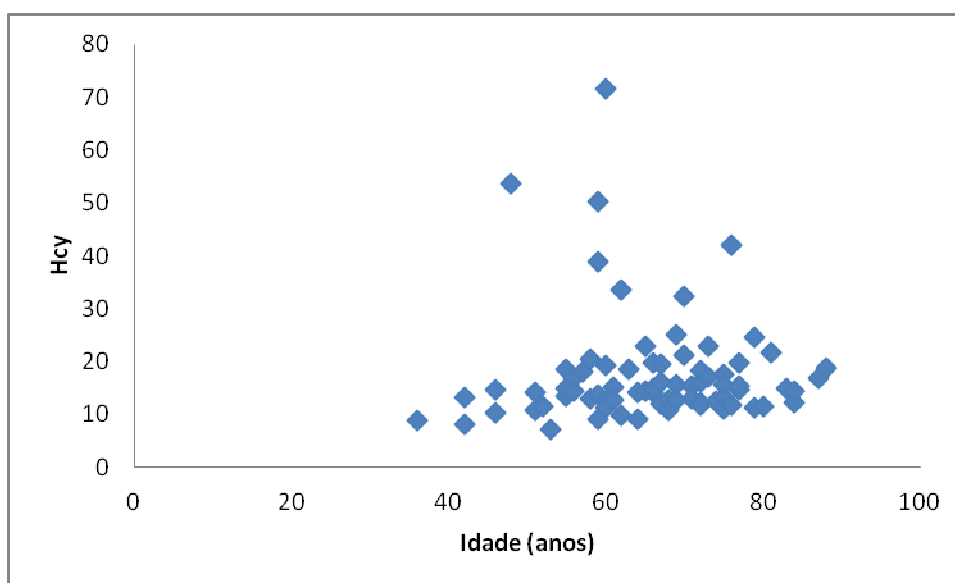
<b>Característica</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>n</b>
Hcy biópsia ( $\mu\text{M}$ )	17,6	10,25	7,1	71,48	83
Hcy cirurgia ( $\mu\text{M}$ )	13,65	6,49	4,89	42,94	43
$\Delta\text{Hcy}$ (biópsia-cirurgia)	-2,89	11,54	-39,43	21,67	40
Cy biópsia ( $\mu\text{M}$ )	595,4	101,71	389,03	951,65	83
Cy cirurgia ( $\mu\text{M}$ )	535,66	170,14	181,06	1055,67	43
$\Delta\text{Cy}$ (biópsia-cirurgia)	-12,27	189,62	-413,03	463,74	40
MSRE N biópsia (%)	44,39	7,03	32,88	56,92	18
MSRE N cirurgia (%)	48,27	11,01	23,62	72,63	26
$\Delta\text{Met N}$ (biópsia-cirurgia)	9,29	17,43	-17,21	36,85	7
MSRE T biópsia (%)	37,01	11,61	12,97	58,56	40
MSRE T cirurgia (%)	35,01	11,45	10,45	64,99	36
$\Delta\text{Met T}$ (biópsia-cirurgia)	-3,39	13,54	-38,51	26,14	23

**DP:** desvio padrão; **n:** número de pacientes; **Hcy:** homocisteína; **Cy:** cisteína;  **$\Delta\text{Hcy}$ :** diferença entre os níveis de homocisteína no perioperatório e no momento da biópsia;  **$\Delta\text{Cy}$ :** diferença entre os níveis de cisteína no perioperatório e no momento da biópsia; **MSRE N:** nível de metilação global do DNA no tecido normal adjacente;  **$\Delta\text{Met N}$ :** diferença nos níveis de metilação do DNA na peça cirúrgica e no material de biópsia, em tecido normal adjacente; **MSRE T:** nível de metilação global do DNA em tecido tumoral;  **$\Delta\text{Met T}$ :** diferença nos níveis de metilação global do DNA na peça cirúrgica e no material de biópsia, em tecido tumoral.

A diferença de entre o número de amostras de tecidos normais e tumorais disponíveis para a determinação da taxa de metilação deveu-se ao fato de que a prioridade dos procedimentos de biópsia seria a de obtenção de amostra tumoral para a avaliação histopatológica e imuno-histoquímica do tumor. Tal fato comprometeu o número de amostras de tecido mamário adjacente ao tumor, obtidas no momento inicial.

Os valores de Hcy e Cy registrados estavam muito dispersos, com ampla diferença entre os valores máximos e mínimos registrados para ambos os parâmetros, como visto na tabela 4.

Levando-se em conta a variação de idade entre as pacientes e também a possibilidade da relação entre os níveis de Hcy e a idade, avaliamos a possibilidade de os níveis de Hcy terem se levado gradualmente em função da idade, calculando a correlação de Pearson entre estes dois parâmetros. A figura 4 representa o gráfico da Hcy em função da idade ( $r: -0,015$ ;  $p= 0.901$ ).



**Figura 4:** níveis de Homocisteína (Hcy) em função da idade das pacientes.

**Hcy:** homocisteína.

Algumas pacientes apresentaram queda expressiva destes parâmetros (Hcy e Cy) enquanto outras apresentaram um aumento também expressivo.

Para a nossa população estudada, tanto os níveis iniciais quanto finais de Cy estavam demasiadamente elevados, como observado na tabela 4.

No projeto “Correlação entre dieta e os níveis globais de metilação do DNA em carcinomas de mama” (Germano PBMR, Gebrim LH, Jasiulionis MG, Correa M, e col.), no qual 30 pacientes do presente estudo haviam participado, foi observada uma correlação importante entre parâmetros bioquímicos e moleculares, que motivou a exploração das relações entre os níveis de Hcy e Cy e suas variações com o nível de metilação global de DNA e sua variação, tanto em tecido tumoral como em tecido normal adjacente. Adicionalmente em

nosso estudo, avaliamos a possível relação entre estes parâmetros e o grau resposta tumoral ( $\Delta Tu$  em cm) ao regime hormonal de curta duração. Como a resposta clínica não corresponde, necessariamente, à resposta patológica, a medida do tamanho final do tumor foi realizada ao exame anatomopatológico.<sup>(190-191,193-194)</sup>

**Tabela 5:** Correlações entre os dados bioquímicos, epigenéticos e variação do tamanho do tumor.

Correlação	Hcy pré	Hcy pós	$\Delta Hcy$	Cy pré	Cy pós	$\Delta Cy$	MSRE N pré	MSRE N pós	$\Delta Met$ N	MSRE T pré	MSRE T pós	$\Delta Met$ T
r	-0,013											
Hcy pós p	0,938											
N	40											
r	-0,549	0,751										
$\Delta Hcy$ p	<0,001	<0,001										
N	40	40										
r	0,579	-0,087	-0,298									
Cy pré p	<0,001	0,592	0,062									
N	83	40	40									
r	-0,035	0,756	0,505	-0,069								
Cy pós p	0,832	<0,001	0,001	0,672								
N	40	43	40	40								
r	-0,342	0,671	0,621	-5,562	0,823							
$\Delta Cy$ p	0,031	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001							
N	40	40	40	40	40							
r	0,056	-0,309	-0,318	-0,083	-0,400	-0,409						
MSRE N p	0,830	0,355	0,340	0,751	0,223	0,212						
pré N	17	11	11	17	11	11						
r	0,067	-0,188	-0,236	0,189	-0,135	-0,182	-0,214					
MSRE N p	0,761	0,427	0,316	0,388	0,569	0,443	0,645					
pós N	23	20	20	23	20	20	7					
r	0,000	-0,657	-0,771	0,286	-0,371	-0,486	-0,679	0,821				
$\Delta Met$ N p	1,000	0,156	0,072	0,535	0,468	0,329	0,094	0,023				
N	7	6	6	7	6	6	7	7				
r	-0,159	-0,067	-0,011	-0,366	-0,122	-0,025	0,346	0,056	-0,543			
MSRE T p	0,353	0,746	0,958	0,028	0,553	0,907	0,174	0,863	0,266			
pré N	36	26	24	36	26	24	17	12	6			
r	-0,060	-0,131	-0,076	0,052	0,026	-0,058	0,370	0,446	0,179	0,405		
MSRE T p	0,743	0,490	0,697	0,776	0,890	0,766	0,293	0,033	0,702	0,062		
pós N	32	30	29	32	30	29	10	23	7	22		
r	0,192	-0,210	-0,432	0,231	0,192	0,021	-0,552	0,224	0,486	-0,699	0,170	
$\Delta Met$ T p	0,404	0,360	0,057	0,313	0,404	0,930	0,098	0,484	0,329	<0,001	0,450	
N	21	21	20	21	21	20	10	12	6	23	22	
r	0,023	0,062	0,100	0,116	-0,110	-0,061	-0,062	-0,047	0,090	-0,291	-0,135	0,084
$\Delta TU$ (cm) p	0,856	0,713	0,562	0,354	0,511	0,725	0,813	0,827	0,848	0,090	0,454	0,710
N	63	38	36	63	38	36	17	24	7	35	33	22

Correlação de Spearman. **r** = coeficiente de correlação; **p** = valor do teste estatístico, **n**= número de pacientes. **Hcy**: homocisteína; **Cy**: cisteína;  **$\Delta Hcy$** : diferença entre os níveis de homocisteína no perioperatório e no momento da biópsia;  **$\Delta Cy$** : diferença entre os níveis de cisteína no perioperatório e no momento da biópsia; **MSRE N**: nível de

metilação global do DNA no tecido normal adjacente;  $\Delta$ Met N: diferença nos níveis de metilação do DNA na peça cirúrgica e no material de biópsia, em tecido normal adjacente; MSRE T: nível de metilação global do DNA em tecido tumoral;  $\Delta$ Met T: diferença nos níveis de metilação global do DNA na peça cirúrgica e no material de biópsia, em tecido tumoral;  $\Delta$ TU: diferença no tamanho do tumor ao diagnóstico e após a cirurgia (cm).

Os níveis de Hcy e Cy, iniciais e no peri-operatório, e suas variações ( $\Delta$ ) estavam correlacionados diretamente, como observado na tabela 5.

Com relação a Cy, uma correlação inversa entre os níveis iniciais de Cy e taxa de metilação global inicial dos tumores se mostrou estatisticamente significativa.

Para avaliar se os parâmetros bioquímicos apresentavam informação prognóstica, consideramos, quando aplicável, todas as pacientes na análise dos desfechos do tipo tempo-para-evento, uma vez que não houve diferença estatística entre as pacientes no que se refere ao período de acompanhamento pós-operatório e regimes complementares empregados. Tanto as mulheres que receberam regime hormonal pré-operatório quanto às demais estavam sujeitas aos mesmos critérios de escolha de tratamentos adjuvantes complementares e não diferiram, significativamente, em relação à chance de recorrência e óbito.

Os tempos médios de sobrevida global (SG) estimados segundo categorias de interesse (dados bioquímicos e moleculares, medicação hormonal neoadjuvante e categorias prognósticas já estabelecidas) e resultado dos testes comparativos estão resumidos na tabela 6.

Para uma adequada categorização das pacientes no presente estudo, em termos de estadiamento clínico, as pacientes com tumores nos estadios I, IIA e IIB são consideradas como portadoras de câncer de mama em estadio inicial. Já as pacientes com tumores IIIA e IIIB são consideradas como portadoras de câncer de mama em estadio tardio.

Com relação ao comprometimento dos linfonodos, as pacientes foram categorizadas em duas possibilidades: presença de comprometimento linfonodal (ao menos um linfonodo comprometido) e ausência de comprometimento linfonodal.



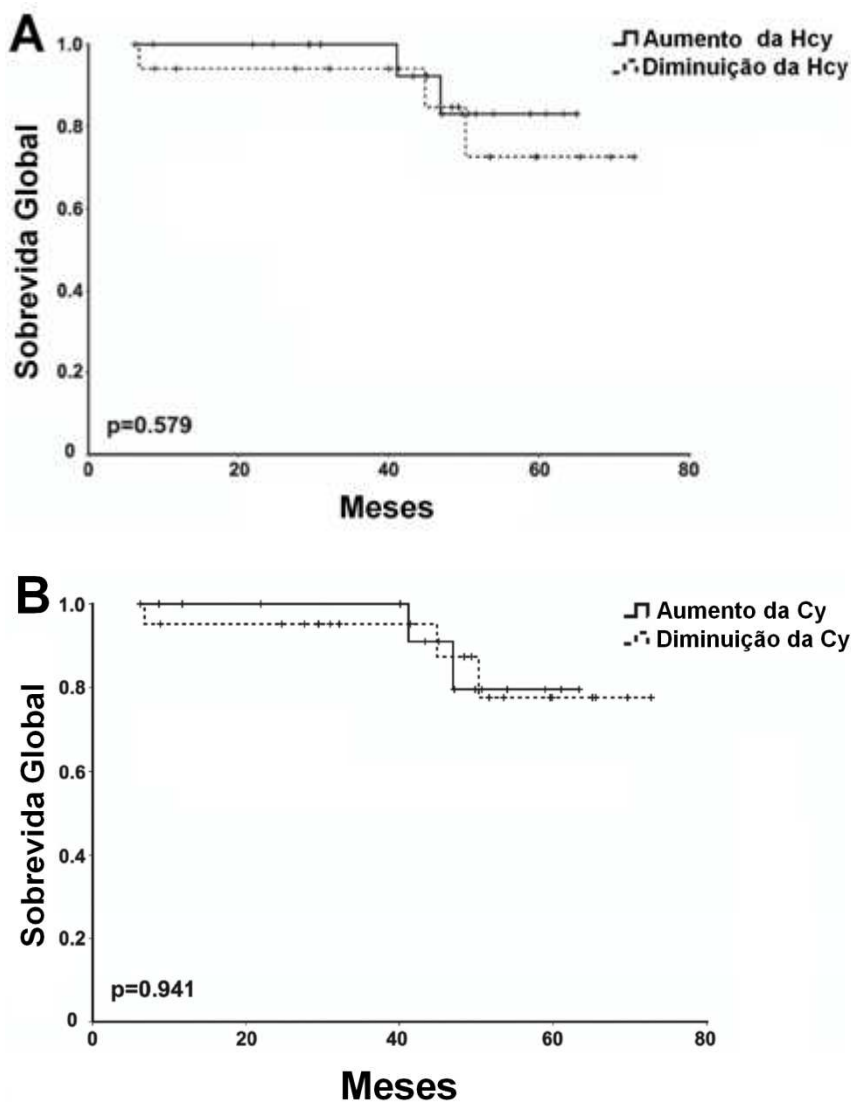
**Tabela 6:** Sobrevida Global (SG) de acordo com variáveis clínicas e patológicas.

Variável	Tempo Médio Estimado em Meses	n	Óbitos	% Óbitos	p
<b>Tratamento</b>					<b>0,204</b>
P	65,43	12	0	0	
T	58,74	27	5	18,5	
A	66,68	19	2	10,5	
Total	63,64	58	7	12,1	
<b>ΔHcy</b>					<b>0,579</b>
Aumento	61,49	19	2	10,5	
Diminuição	63,43	18	3	16,7	
Total	65,74	37	5	13,5	
<b>ΔCy</b>					<b>0,941</b>
Aumento	59,39	15	2	13,3	
Diminuição	65,11	22	3	13,6	
Total	65,74	37	5	13,5	
<b>Estádio Clínico</b>					<b>0,959*</b>
Inicial	67,47	58	5	8,6	
Tardio	61,53	15	3	20	
Total	66,43	73	8	11	
<b>N (Linfonodos Palpáveis)</b>					<b>0,082</b>
Presença	57,45	34	6	17,6	
Ausência	70,08	42	2	14,8	
Total	66,55	76	8	10,5	
<b>T</b>					<b>0,831*</b>
1	70,03	2	0	0	
2	66,01	56	6	10,7	
3	59,69	6	1	16,7	
Total	64,99	64	7	10,9	
<b>RE ou RP</b>					<b>0,435*</b>
Positivo/Positivo	62,68	35	5	14,3	
Negativo/Positivo ou Positivo/Negativo	51,83	12	1	8,3	
Negativo/Negativo	60,07	19	3	15,8	
Total	62,32	66	9	13,6	

\*Resultado do teste de Breslow. n: número de pacientes; p = valor do teste estatístico; P: placebo; T: tamoxifeno; A: anastrozol; ΔHcy: diferença entre os níveis de homocisteína no perioperatório e no momento da biópsia; ΔCy: diferença entre os níveis de cisteína no perioperatório e no momento da biópsia; RE: receptor de estrogênio alfa; RP: receptor de progesterona.

Com relação às análises dos desfechos clínicos do tipo tempo-para-evento, observamos, inicialmente, que a Sobrevida Global não se alterou estatisticamente segundo tratamentos (Tamoxifeno, Anastrozol e Placebo),

variação da Hcy ou Cy, estadiamento clínico, valor de T (classificação do tamanho do tumor ao estadiamento clínico) e receptores hormonais (status do RE, RP ou a combinação de ambos). A presença de linfonodos comprometidos também não acarretou alteração estatisticamente significativa nos tempos de sobrevida, Figura 5.



**Fig 5: Variações da Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) não se correlacionam com SG (Sobrevida Global).**

Curvas de Kaplan-Meier para SG para aumento e diminuição dos níveis da \_Hcy (A) e \_Cy (B) ( $p=0,579$  e  $p=0,941$ , respectivamente). + indica evento censurado. Eixo Y(SG): porcentagem de pacientes vivos. Adaptado de Lerardi e col., 2013, <sup>(244)</sup>

Os tempos médios de sobrevida livre de doença (SLD), estimados segundo categorias de interesse (dados bioquímicos e moleculares, medicação

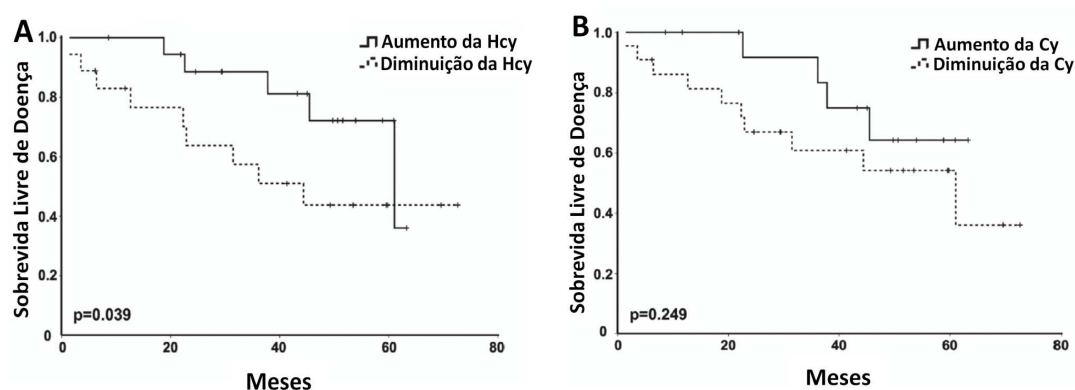
neoadjuvante e categorias prognósticos já estabelecidos) e resultado dos testes comparativos estão resumidos na tabela 07.

**Tabela 7:** Tempos médios de Sobrevida Livre de Doença (SLD) estimados segundo categorias de interesse e resultado dos testes comparativos

Variável	Tempo Médio Estimado em Meses	n	Recaída	% Recaída	p
<b>Tratamento</b>					<b>0,471</b>
P	52,1	12	3	25	
T	50,15	27	9	33,3	
A	61,25	19	4	22,1	
Total	56,07	58	16	27,6	
<b>ΔHcy</b>					<b>0,039*</b>
Aumento	54,1	19	5	26,3	
Diminuição	43,69	18	9	50	
Total	51,19	37	14	37,8	
<b>ΔCy</b>					<b>0,249</b>
Aumento	53,59	15	4	26,7	
Diminuição	46,35	22	10	45,5	
Total	51,19	37	14	37,8	
<b>Estadio Clínico</b>					<b>0,037</b>
Inicial	58,4	58	14	24,1	
Tardio	43,39	15	8	53,3	
Total	55,42	73	22	30,1	
<b>N (Linfonodos Palpáveis)</b>					<b>0,003</b>
Presença	43,93	34	16	47,1	
Ausência	64,14	42	6	14,3	
Total	56,05	76	22	28,9	
<b>T</b>					<b>0,486*</b>
1	70,03	2	0	0	
2	56,87	56	15	26,8	
3	44,1	6	3	50	
Total	55,88	64	18	28,1	
<b>RE ou RP</b>					<b>0,701*</b>
Positivo/Positivo	54,75	35	10	28,6	
Negativo/Positivo ou Positivo/Negativo	45,75	12	3	25	
Negativo/Negativo	51,16	19	6	31,6	
Total	54,13	66	19	28,8	

**p** = valor do teste estatístico (log-rank e Breslow); **n**: número de pacientes; \*Resultado do teste de Breslow; **P**: placebo; **T**: tamoxifeno; **A**: anastrozol; **ΔHcy**: diferença entre os níveis de homocisteína no perioperatório e no momento da biópsia; **ΔCy**: diferença entre os níveis de cisteína no perioperatório e no momento da biópsia; **RE**: receptor de estrogênio alfa; **RP**: receptor de progesterona.

Com relação à SLD, esta apresentou uma influência negativa e importante do ponto de vista estatístico do estadiamento clínico e da presença de linfonodos. A Sobrevida Livre de Doença não sofreu influência dos valores de T e do status dos receptores hormonais. Com relação aos metabólitos, as pacientes que apresentam elevação nos níveis de Hcy, ou seja um valor de  $\Delta$ Hcy positivo, apresentaram maior tempo de sobrevida livre de doença, tal fato parece também ocorrer em relação à variação de Cy ou  $\Delta$ Cy. O impacto das variações nos níveis destes metabólitos sobre a SLD é mais bem observado nas curvas de Kaplan-Meier da figura 6.



**Fig 6: Variações dos níveis da Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) se correlacionam com a SLD (Sobrevida Livre de Doença).** Curvas de Kaplan-Meier para SLD para aumento e diminuição nos níveis da \_Hcy (A) e \_Cy (B). ( $p=0,039$  e  $p=0,249$ , respectivamente). + indica evento censurado. Eixo Y (SLD): porcentagem de pacientes sem recorrência da doença. Adaptado de Ierardi e col., 2013.<sup>(244)</sup>

Analisando conjuntamente os fatores que influenciaram a Sobrevida Livre de Doença na análise univariada, observamos que a variação na Hcy ( $\Delta$ Hcy) e a presença de linfonodos exercem influência no tempo de sobrevida livre de doença, com o aumento nos níveis de Hcy diminuindo a chance de recidiva, ao passo que a presença de linfonodos comprometidos aumenta a chance de recidiva da doença. O modelo de risco proporcional de Cox, incluindo estadiamento clínico, comprometimento linfonodal e variação da Hcy, demonstrou que o comprometimento linfonodal e a variação da Hcy são fatores prognósticos independentes no que diz respeito à Sobrevida Livre de Doença (Tabela 8).

**Tabela 8:** Análise multivariada da Sobrevida Livre de Doença (SLD)

Modelo	Variável	RR	IC ( 95% )		p
			Inferior	Superior	
Parcial	<b><math>\Delta</math>Hcy</b>	0,96	0,92	1	<b>0,04</b>
	<b>Estadio Clínico</b>				0,33
	Inicial	1			
	Tardio	1,93	0,51	7,21	
	<b>N (Linfonodos palpáveis)</b>				0,116
	Ausência	1			
Final	Presença	2,91	0,77	11	
	<b><math>\Delta</math>Hcy</b>	0,96	0,92	1	<b>0,042</b>
	<b>N (Linfonodos palpáveis)</b>				<b>0,027</b>
	Ausência	1			
	Presença	3,86	1,16	12,79	

RR: razão de risco; IC: intervalo de confiança; p = valor do teste estatístico (modelo de riscos proporcionais de Cox);

$\Delta$ Hcy: diferença entre os níveis de homocisteína no perioperatório e no momento da biópsia.

Como o estadiamento clínico e o comprometimento linfonodal influenciam a SLD, assim com a  $\Delta$ Hcy, o próximo passo foi analisar os níveis de Hcy em relação a estes parâmetros clínicos nos momentos em que estes dados foram aferidos e que serviram para a determinação do valor da sua variação (momentos pré e pós o regime hormonal neoadjuvante). Nas tabelas 9 e 10 temos as medidas de tendência central estratificada nos momentos por estadio clínico e comprometimento de linfonodos.

**Tabela 9:** Valores médios de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) de acordo com momento (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) e estadio.

Variável	Estadiamento Clínico					
	Inicial			Tardio		
	Média	DP	n	Média	DP	n
Hcy (Pré)	17,18	9,25	59	21,08	13,64	18
Hcy (Pós)	14,42	6,66	37	8,78	1,97	5
Cy (Pré)	582,17	96,2	59	655,89	112,19	18
Cy (Pós)	556,8	169,66	37	391,99	117,99	5

DP: desvio padrão; n: número de pacientes; Hcy: homocisteína; Cy: cisteína.

**Tabela 10:** Valores médios de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo momentos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) e presença de linfonodos comprometidos.

Variável	N (Linfonodos comprometidos)					
	Presença			Ausência		
	Média	DP	n	Média	DP	n
Hcy (Pré)	20,72	13,39	36	15,59	6,23	43
Hcy (Pós)	13,65	8,98	19	13,65	3,73	24
Cy (Pré)	611,36	117,29	36	586,58	89,88	43
Cy (Pós)	474,57	154,61	19	584,02	169,02	24

DP: desvio padrão; n: número de pacientes; Hcy: homocisteína; Cy: cisteína.

Na tabela 12, as médias de Hcy e Cy não diferem entre os estadios clínicos no momento pré regime hormonal neoadjuvante, mas o comportamento da Hcy é melhor elucidada na tabela 11, onde observamos que os valores médios da Homocisteína se comportam de maneira diferente nos estadios entre os momentos clínicos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) de maneira independente da presença de linfonodos comprometidos. Ainda na Tabela 11, observamos também que as médias da Cy apresentam comportamento estatisticamente diferente entre os momentos, porém de forma dependente do comprometimento de linfonodos.

**Tabela 11:** Modelos de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo momentos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante) e estadiamento clínico ou presença de linfonodo.

Variável	Fator	Estatística de teste (Wald)	p
Hcy	Momento	17,84	<0,001
	Estadio Clínico	0,19	0,662
	Momento*Estadio clínico	7,09	0,008
Cy	Momento	21,93	<0,001
	Estadio Clínico	2,46	0,117
	Momento*Estadio clínico	14,67	<0,001
Hcy	Momento	8,06	0,005
	N (Linfonodos Palpáveis)	2,49	0,115
	Momento*(Linfonodos palpáveis)	2,62	0,106
Cy	Momento	6,66	0,01
	N (Linfonodos Palpáveis)	2,51	0,113
	Momento*(Linfonodos palpáveis)	6,15	0,013

p: valor do teste estatístico (ANOVA); Hcy: homocisteína; Cy: cisteína.

Na tabela 12 observamos que tanto Hcy como Cy apresentam redução estatisticamente significativa de seus valores médios apenas no estadio tardio e, conseqüentemente, os valores médios destes analitos são estatisticamente menores, no momento pós regime hormonal, nas pacientes com estadiamento tardio quando comparadas às pacientes no estadio inicial. Notamos, também, que os valores médios do Cy apresentam uma diferença importante, mas não estatisticamente significativa, entre os estadios clínicos no momento pré regime hormonal.

**Tabela 12.** Análises multivariadas de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo estadiamentos clínicos e momentos (pré e pós regime hormonal neoadjuvante).

Variável	Estadio clínico/Momento	Diferença Média	Erro Padrão	p
Hcy	Inicial/pré Vs Tardio/pré	-3,9	3,34	>0,999
	Inicial/pré Vs Inicial/pós	2,76	1,6	0,509
	Tardio/pré Vs Tardio/pós	12,17	3,15	<b>0,001</b>
	Inicial/pós Vs Tardio/pós	5,51	1,34	<b>&lt;0,001</b>
Cy	Inicial/pré Vs Tardio/pré	-73,54	28,54	0,06
	Inicial/pré Vs Inicial/pós	26,87	30,52	>0,999
	Tardio/pré Vs Tardio/pós	268,11	55,11	<b>&lt;0,001</b>
	Inicial/pós Vs Tardio/pós	167,71	54,5	<b>0,013</b>

p: valor do teste estatístico; Hcy: homocisteína; Cy: cisteína.

Como consequência, notamos que tanto para a Hcy quanto para a Cy temos uma queda considerável em relação às médias iniciais das concentrações destes metabólitos após o tratamento hormonal adjuvante (Tamoxifeno, anastrozol ou placebo) nos estadios avançados, ou seja, pacientes dos estadios tardios apresentaram quedas nos valores de ambos os metabólitos de maneira significativa do ponto de vista estatístico, como evidenciado na Tabela 12.

Considerando a presença de linfonodos comprometidos, o principal fator prognóstico em câncer de mama (fato significativo também evidenciado em nossa coorte), analisamos a possível influência deste dado clínico no comportamento dos metabólitos.

**Tabela 13:** Resultados das comparações múltiplas da Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) segundo presença de linfonodo e momentos da coleta (pré e pós regime hormonal neoadjuvante).

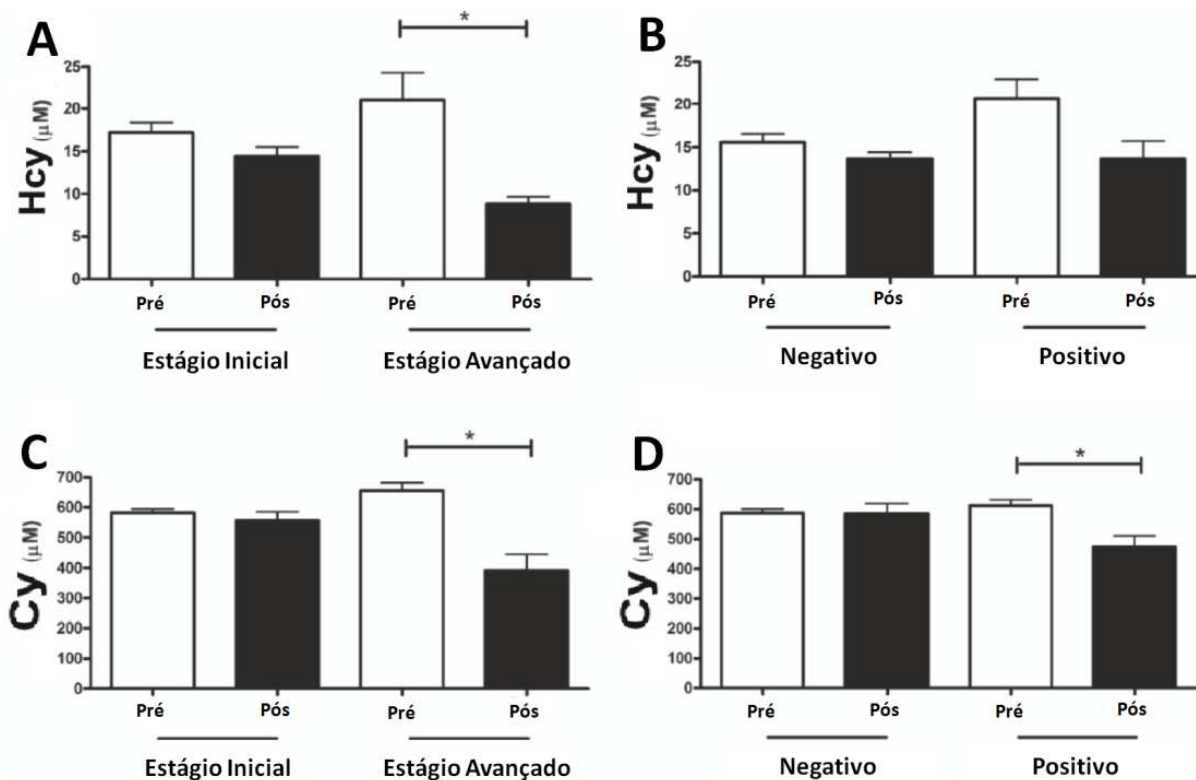
Variável	N (Linfonodos comprometidos)/ Momento	Diferença Média	Erro Padrão	p
Hcy	Pré Vs Pós	4,23	1,49	<b>0,005</b>
Cy	Presença pré Vs Ausência pré	24,81	23,56	>0,999
	Presença pré Vs Presença pós	136,98	40,85	<b>0,005</b>
	Ausência pré Vs Ausência pós	2,75	35,53	>0,999
	Presença pós Vs Ausência pós	-109,43	48,32	0,141

p: resultado do teste estatístico; **Hcy**: homocisteína; **Cy**: cisteína.

Na tabela 13 observamos que há redução nos valores médios da Hcy em ambos os momentos de coleta, independente da presença de linfonodo. A média da Cy se reduz estatisticamente apenas em pacientes com presença de linfonodos comprometidos, compatível com os resultados apresentados na tabela 11, onde observamos que o comportamento da Cy é dependente do comprometimento dos linfonodos.

Os comportamentos da Hcy e Cy em relação ao estadió clínico e presença de linfonodos comprometidos estão resumidos no gráfico da figura 7 abaixo.





**Figura 7: Níveis de Homocisteína (Hcy) e Cisteína (Cy) apresentam maior diminuição após o regime hormonal de curta duração em pacientes com estágio clínico avançado.** Níveis de Hcy e Cy antes (pré) e após (pós) tratamento nos estádios iniciais e tardios (A e C, respectivamente), e na presença ou ausência de linfonodos comprometidos (B e D, respectivamente). \* $p < 0.05$ . Adaptado de Ierardi e col., 2013, <sup>(244)</sup>

Com relação aos diferentes tratamentos hormonais empregados, exploramos a possível influência de cada droga nas variações dos dados bioquímicos e moleculares, com o intuito de avaliar se cada uma delas influenciou o comportamento dos metabólitos e a alteração da metilação do DNA de maneira diferente. Além disso, avaliamos se as respostas dos tumores alcançadas em cada braço da randomização diferiam estatisticamente, buscando identificar se havia superioridade de uma droga sobre a outra. Caso houvesse diferença significativa nestes parâmetros, poderíamos identificar, além da melhor droga, marcadores bioquímicos e moleculares da resposta tumoral, com potencial uso na prática clínica.

**Tabela 14:** Descrição das variações na Homocisteína (Hcy), Cisteína (Cy), metilação e tamanho do tumor segundo tratamentos e resultado das comparações.

Variável	Tratamento	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	n	p
$\Delta$ Hcy	P	-2,06	6,08	-1,7	-11,58	8,37	8	0,372
	T	-4,3	8,65	-2,3	-28,24	6,17	17	
	A	-1,73	16,21	0,53	-39,43	21,67	15	
	Total	-2,89	11,54	-1,2	-39,43	21,67	40	
$\Delta$ Cy	P	-52,5	176,75	-101	-274,11	301,96	8	0,414
	T	-29,08	214,66	-19	-413,03	463,74	17	
	A	28,24	169,88	67,5	-276,1	315,2	15	
	Total	-12,27	189,62	-18	-413,03	463,74	40	
$\Delta$ Met T	P	-7,33	10,37	-7,3	-14,66	0,01	2	0,853
	T	-1,55	13,51	-6,6	-20,58	26,14	13	
	A	-5,39	15,25	-0,3	-38,51	10,26	8	
	Total	-3,39	13,54	-2,5	-38,51	26,14	23	
$\Delta$ Met N	T	4,39	18,99	11,9	-17,21	18,47	3	0,724
	A	12,98	18,02	10,4	-5,74	36,85	4	
	Total	9,3	17,43	11,9	-17,21	36,85	7	
$\Delta$ TU (pré - pós em cm)	P	0,54	1,43	0,5	-1,5	3,6	12	0,687
	T	0,64	1,95	1	-3,5	4	26	
	A	0,96	1,66	1	-3	4	19	
	Total	0,72	1,73	1	-3,5	4	57	

**n:** número de pacientes; **p:** resultado do teste estatístico (Kruskal-Wallis); **P:** placebo; **T:** tamoxifeno; **A:** anastrozol;  **$\Delta$ Hcy:** diferença entre os níveis de homocisteína no perioperatório e no momento da biópsia;  **$\Delta$ Cy:** diferença entre os níveis de cisteína no perioperatório e no momento da biópsia;  **$\Delta$ Met N:** diferença nos níveis de metilação do DNA na peça cirúrgica e no material de biópsia, em tecido normal adjacente;  **$\Delta$ Met T:** diferença nos níveis de metilação global do DNA na peça cirúrgica e no material de biópsia, em tecido tumoral;  **$\Delta$ TU:** diferença no tamanho do tumor ao diagnóstico e após a cirurgia (cm).

Com relação aos diferentes braços de tratamento do estudo clínico, não há diferença estatisticamente significativa nas variações da homocisteína, cisteína, metilação e tamanho do tumor entre os tratamentos (Tamoxifeno, Anastrozol e placebo; todos com  $p > 0,05$  na tabela 13).

## 6. DISCUSSÃO

As pacientes participantes do estudo foram acompanhadas por um período de tempo considerável, e a sobrevida livre de doença pode ser adequadamente apurada. Além disso, apresentaram ótima aderência ao esquema neoadjuvante de curta duração, sendo que nenhuma foi censurada dos cálculos estatísticos devido ao não cumprimento do regime inicial de 4 semanas. Se do ponto de vista dos níveis iniciais da Hcy, não pudemos classificar todas as pacientes como portadoras de Hiperhomocisteinemia, todas elas apresentaram valores extremamente elevados de Cy ao diagnóstico inicial (acima de 300  $\mu\text{mol/L}$ ). Nesta população, foi constatada também, correlação interessante entre a variação da Hcy e a Sobrevida Livre de Doença. Esta observação chama a atenção para descobertas importantes no estudo destes aminoácidos dentro da oncologia. Entretanto, existem algumas limitações nesta população no que diz respeito ao número de indivíduos envolvidos e sua heterogeneidade em termos de condições clínicas e regimes terapêuticos pós cirúrgicos empregados.

Temos pacientes que receberam ou não quimioterapia citotóxica neoadjuvante, foram submetidas à cirurgia radical ou conservadora da mama, com ou sem irradiação loco-regional, e, de maneira mais significativa e com impacto em estudos investigando fatores prognósticos, muitas pacientes receberam quimioterapia sistêmica adjuvante com agentes citotóxicos (associada ou não à endocrinoterapia de longa duração).

O estudo tomou lugar em duas instituições públicas com níveis de complexidade de atenção semelhantes, sendo que os tratamentos propostos e empregados pelos médicos atendentes estavam de acordo com os recursos disponíveis nestas instituições.

Os preceitos clínicos foram determinantes no planejamento e desenho dos dois estudos anteriores que recrutaram as pacientes. Como as pacientes foram submetidas a diferentes esquemas terapêuticos, incluindo terapia sistêmica adjuvante, somente fatores prognósticos extremamente relevantes poderiam ser destacados neste desenho de estudo. No entanto, no que diz respeito à avaliação de marcadores preditivos precoces de resposta

terapêutica e comparação entre agentes terapêuticos, o estudo representa um ótimo exemplo da utilização do cenário neoadjuvante como modelo experimental, sem alterar o curso e o prazo normais do tratamento destas pacientes.

No que diz respeito às pacientes envolvidas no estudo clínico, além dos tratamentos complementares à cirurgia radical ou conservadora definitiva (possibilidade de radioterapia e quimioterapia e/ou endocrinoterapia adjuvante) estas pacientes foram submetidas a um curto período de tratamento com drogas antiestrogênicas (Tamoxifeno e Anastrozol) ou placebo antes da cirurgia. O uso de placebo, nesta condição, foi justificado, pois o período de complementação da rotina pré-operatória, nos serviços em que as pacientes estavam em acompanhamento tem duração de, aproximadamente, um mês. Uma paciente, que inicialmente seria recrutada no estudo clínico foi excluída, pois apresentava indicação formal de quimioterapia citotóxica neoadjuvante (tumor localmente avançado) e foi excluída dos cálculos estatísticos referentes ao estudo clínico.

Com relação à possibilidade de tratamento com duas medicações diferentes, apenas nos últimos anos os inibidores de aromatase de terceira geração como o Letrozol e o Anastrozol se mostraram superiores ao Tamoxifeno, quando empregados na adjuvância e neoadjuvância de tumores com expressão de receptores hormonais, em mulheres na menopausa. Inclusive, muitas pacientes que estavam em uso de Tamoxifeno adjuvante passaram a usar Anastrozol ao longo do acompanhamento. No entanto, à época do desenho do estudo clínico não havia evidências a respeito da superioridade dos inibidores da aromatase, apenas dados preliminares promissores em favor destes, e havia a necessidade de estudos comparativos que pudessem ajudar na seleção da melhor escolha terapêutica em termos de custo/benefício. Naquele momento, o Anastrozol foi selecionado como representante dos inibidores de aromatase de terceira geração, pois era o representante desta classe que estava disponível em nosso país.

O uso do regime neoadjuvante como cenário pré-operatório experimental, pode trazer informações importantes a respeito do grau de reposta do tumor a regimes terapêuticos. Com o emprego das medicações

antiestrogênicas de diferentes mecanismos de ação e, medindo os efeitos nos marcadores analisados, os pesquisadores envolvidos na concepção do projeto do estudo clínico esperavam obter informações que norteassem a conduta clínica futura nas pacientes com câncer de mama com expressão de receptores hormonais ou positivos para receptores hormonais.<sup>(245-248)</sup>

Até o momento, não há, na literatura especializada, estudos explorando o potencial uso da Hcy e da Cy como marcadores clinicamente úteis em oncologia. Dados preliminares da pesquisa, que recrutou inicialmente parte das pacientes participantes do estudo atual (“Correlação entre dieta e os níveis globais de metilação do DNA em carcinomas de mama”) apontaram correlações interessantes entre os níveis de Hcy e hipometilação global do genoma e deste parâmetro molecular com características associadas à agressividade tumoral. Desta forma a hipótese de que a Hcy seria um marcador do nível de hipometilação global, um dos principais mecanismos envolvidos oncogênese mamária, tornou-se palpável. Após o período de tempo considerado, o levantamento dos prontuários traria dados retrospectivos importantes acerca da sobrevida destas pacientes, com a possibilidade de observação de correlações prognósticas. O estudo presente tem, portanto, a intenção de criar hipóteses a serem testadas em grupos com maior número de observações, e de maneira prospectiva.

O acompanhamento destas pacientes evidenciou que a coorte, como um todo, apresentou aparente bom prognóstico. Apenas 9 (9,28%) das pacientes haviam falecido em decorrência do câncer de mama ao longo do período de acompanhamento, o que influenciou a falta de correlação significativa entre fatores prognósticos consagrados, com o comprometimento de linfonodos e o tamanho do tumor, e a SG. Ao final do seguimento, que durou, em média, 5,60 anos, 71 das pacientes estavam vivas, totalizando 71% de sobrevida em pouco mais de 5 anos (15 pacientes perderam seguimento e 2 faleceram por eventos cardiovasculares). Este dado é de difícil comparação com os dados apresentados na literatura, uma vez que as pacientes encontram-se estratificadas por diversos parâmetros clínicos e divididas em diferentes braços terapêuticos de acordo com critérios de inclusão particulares a cada estudo.

De maneira geral, a sobrevida mundial para câncer de mama, em 5 anos, é de 61%.<sup>(2)</sup> No entanto, nesta estimativa são levados em conta casos de tumores metastáticos, enquanto a população estudada consiste apenas de pacientes com tumores ressecáveis. Em nossa coorte, onde 71% das pacientes apresentavam tumores nos estadios I e II (IIA e IIB), foi observada uma taxa de mortalidade específica por câncer de 9% em pouco mais de 5 anos de acompanhamento. Para os estadios I e II, de acordo com os levantamentos de Bland e colaboradores, a mortalidade seria de 5 a 12% em 10 anos.<sup>(13)</sup> Com relação à resposta ao regime hormonal neoadjuvante de curta duração, uma paciente pertencente ao braço de tratamento do anatrozol apresentou um tumor residual de menos de 1mm à cirurgia definitiva. Provavelmente, esta paciente, se completasse o esquema neoadjuvante por 4 meses, apresentaria uma resposta patológica completa. Apenas recentemente, o tratamento hormonal primário, com inibidores de aromatase de terceira geração por 4 meses, demonstraram benefícios comparáveis aos da quimioterapia neoadjuvante.<sup>(249)</sup> Estes benefícios representam aumento do número de cirurgias conservadoras da mama embora não altere, significativamente, a SG e SLD já alcançadas com o emprego de terapia hormonal adjuvante.<sup>(250)</sup>

Devido ao baixo número de eventos e tempo de seguimento muito variado entre as pacientes (de 4 a 7 anos), fatores prognósticos consagrados tiveram pouca influência na Sobrevida Global. Nesta amostra, apenas o comprometimento de linfonodos (1 ou mais linfonodos comprometidos) mostrou correlação com a SG das pacientes.

O status dos receptores hormonais (tumores positivos para RE, RP ou mesmo ambos) foi revisado centralmente e analisada de acordo com o escore de Allred por dois patologistas em concordância com estudos avaliando a expressão destes receptores. A positividade dos receptores hormonais não mostrou influência como fator prognóstico, o que já é esperado uma vez que real valor do status tumoral para estes marcadores esta em sua contribuição como fator preditivo de resposta à terapia hormonal.

De maneira geral, os tumores apresentaram resposta à endocrinoterapia, o que foi acompanhado pela diferença de tamanho

observada ao diagnóstico e na peça cirúrgica. A escolha para a avaliação do tamanho final ao exame patológico provavelmente diminui a influência do processo inflamatória decorrente do procedimento de biópsia. A avaliação clínica da resposta em um intervalo de tempo tão curto quanto 4 semanas seria imprópria devido ao edema e hematoma que resultam do procedimento de biópsia (um período de 2 a 3 meses seria necessário para uma adequada avaliação clínica da resposta tumoral). A escolha de diferentes formas de avaliação inicial (clínica) e final (patológica) do tamanho do tumor não influenciou de maneira significativa os resultados. Embora a menor precisão da avaliação clínica da medida do tumor pode ser observada pela diminuição dos tumores das pacientes no grupo placebo, esta diferença foi ínfima e acreditamos que isto não possa ser considerado um viés a favor das taxas de resposta à endocrinoterapia.

Entre as pacientes que participaram do estudo clínico, 10 se mostraram como portadoras de tumor de mama negativos para a expressão de ambos os receptores hormonais. Para evitar viés de seleção durante a distribuição randômica das pacientes, as pacientes que preenchiam os critérios de inclusão (menopausadas com tumores ressecáveis) iniciavam o regime hormonal imediatamente após a realização da biópsia confirmatória. Os médicos atendentes dos serviços participantes do estudo, iniciavam as medicações antes de receberem o resultado da Imunoistoquímica, cuja conclusão era liberada para consulta ao longo do período de 4 semanas que antecedia a cirurgia, em conjunto com os demais exames da rotina pré-operatória nestes serviços.

A influência fatores patológicos como o tipo e grau histológico não poderiam ser adequadamente avaliadas nesta amostra, uma vez que a esmagadora maioria dos tumores era do tipo ductal e pouco diferenciados de grau histológico II.

Aumento nos níveis de Hcy tem sido estudado já há um bom tempo como fator de risco para doença cardiovascular e mais recentemente tem sido correlacionado com doenças neurológicas e complicações na gravidez.<sup>(251)</sup> A quantificação da Hcy plasmática é feita por metodologia relativamente simples e rápida e existem estudos apontando uma possível contribuição da Hcy na

carcinogênese a como um fator de risco para câncer de mama.<sup>(84-85)</sup> Poucos biomarcadores bioquímicos práticos e baratos estão disponíveis rotineiramente para prever prognóstico ou resposta ao tratamento do câncer, e, neste contexto, Hcy poderia ser um biomarcador útil.

O Câncer de mama é um tipo muito comum de câncer, e têm sido extensivamente estudado. Ao longo do século passado houve uma evolução progressiva e dramática do entendimento desta doença, o que foi acompanhado de uma melhora gradual na forma da abordagem terapêutica. Tratamentos radicais passaram gradualmente do posto de abordagens mais comuns para opções de exceção no cuidado do câncer de mama. Por se tratar de uma doença sistêmica, grandes abordagens cirúrgicas radicais traziam mais comorbidades com pouco ou nenhum benefício clínico. O emprego da quimioterapia adjuvante representou mais um avanço relacionado a este entendimento da doença. Posteriormente, houve o aparecimento de terapias alvo, fato que pode ser adequadamente exemplificado com o advento e evolução da terapia antiestrogênica. A Terapia hormonal mudou vertiginosamente o prognóstico dos tumores com expressão de receptores hormonais e, hoje em dia, pesquisadores tem se esforçado para poupar pacientes de se submeterem à quimioterapia citotóxica adjuvante e seus efeitos colaterais. Todo este processo só foi possível diante de um melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença e do consequente uso racional de fatores prognósticos e biomarcadores identificados neste processo.

Embora alguns biomarcadores estejam disponíveis na literatura, muitos pesquisadores continuam buscando novos candidatos para que o diagnóstico e o tratamento do câncer se tornem cada vez mais personalizado.<sup>(252-254)</sup>

Entretanto, muitos destes esforços se concentram em perfis moleculares e dependem de instalações de alta complexidade para abordagens genéticas e processamento de amostras teciduais, que não são amplamente disponíveis.

O Metabolismo da Hcy pode sofrer interferência por defeitos nas vias de Transulfuração e/ou Remetilação, que podem causar um aumento nos seus níveis. Embora a Hcy possa ser considerado um marcador sensível de alterações metabólicas importantes como deficiência absoluta ou funcional de



Ácido Fólico ou outras vitaminas integrantes do ciclo metabólico da Metionina, em decorrência de uma série de processos patológicos, como os inflamatórios crônicos, não é possível excluir completamente um papel causal da Hcy no agravamento destas condições.<sup>(82)</sup>

A Hcy em excesso pode levar ao aumento dos níveis de Cy, que também tem sido relacionado a alguns processos patológicos, incluindo o câncer.<sup>(84)</sup>

A Hcy e a Cy estão relacionados no ciclo dos nutrientes de carbono único e são potenciais fatores de risco e biomarcadores de neoplasias, uma vez que participam do estresse oxidativo, de maneira indireta, e estão relacionados à hipometilação do DNA, com suas consequências sobre a instabilidade do material genético e nível de expressão de diferentes genes (como proto-oncogenes e supressores de tumor).<sup>(82,85,123-141)</sup>

De acordo com Jacobsen, o espectro normal de valores para a Hcy plasmática é de 5 a 15  $\mu\text{mol/L}$ . Valores entre 15 e 25  $\mu\text{mol/L}$  correspondem a uma hiperhomocisteinemia leve; entre 25 a 50  $\mu\text{mol/L}$  são considerados como uma hiperhomocisteinemia intermediária e acima de 50  $\mu\text{mol/L}$ , hiperhomocisteinemia severa.<sup>(255)</sup>

Em nosso estudo observamos pacientes que poderiam ser enquadradas tanto na categoria normal para níveis plasmáticos de Hcy como, também, nas diversas categorias clínicas de hiperhomocisteinemia.

Já a concentração da Cy plasmática de indivíduos considerados saudáveis é em torno de 250  $\mu\text{mol/L}$ . Valores acima de 300  $\mu\text{mol/L}$  são categorizados como elevados, em estudos que avaliaram o risco de doença cardiovascular e Cy.<sup>(256)</sup>

Para a nossa população estudada, tanto os níveis iniciais quanto finais de Cy estavam demasiadamente elevados. Antes de receber o regime hormonal neoadjuvante, todas as pacientes apresentavam valores anormalmente elevados de Cy e algumas poucas pacientes apresentaram valores normais ou baixos (abaixo de 250  $\mu\text{mol/L}$ ) deste metabolito, após terem recebido o esquema hormonal neoadjuvante.

De maneira geral, houve grande variação entre os valores de Hcy e Cy das pacientes ao diagnóstico, com média de Hcy inicial considerada como

pertencente a faixa de Hiperhomocisteinemia leve (17,60  $\mu\text{mol/L}$ ) e a média dos valores finais estava abaixo de 15,00  $\mu\text{mol/L}$ . Já a Cy apresentou valores elevados tanto quando consideramos a média dos valores ao diagnóstico quanto no peri-operatório. Além do fato de valores de Cy serem da ordem de 20 vezes os valores da Hcy, todos os valores iniciais da Cy estavam consistentemente elevados acima do nível de significância clínica (acima de 300  $\mu\text{mol/L}$ ).

As amostras de sangue foram submetidas a dosagem destes aminoácidos em dias diferentes, desta forma, tanto as aferições da Hcy quanto da Cy foram processadas em mais de uma rotina laboratorial. Se considerarmos que foi utilizada uma metodologia de referência, em um laboratório que segue as orientações de boas práticas, a hipótese de que todas as medidas da Cy estariam sujeitas a um mesmo erro sistemático analítico (detector fluorimétrico mal calibrado, por exemplo) se torna improvável. Pode-se inferir que os níveis de Cy que representam melhor o distúrbio metabólico do Ciclo dos Nutrientes de Carbono Único neste grupo de indivíduos, embora algumas pacientes apresentassem, também, níveis extremos de Hcy ao diagnóstico.

Os níveis de Hcy são determinados por três possíveis reações do ciclo da Metionina: Remetilação, Transulfuração e Transmetilação; ao passo que a Cy é produzida a partir de apenas uma destas reações, a Transulfuração e, portanto, estaria teoricamente mais sujeita alterações diante de processos patológicos de repercussão sistêmica. Isto, provavelmente, explica um fato evidenciado por Lin e colaboradores no estudo acerca dos níveis de cisteína em uma coorte dentro do estudo Women's Health Study: quando pacientes que tiveram o diagnóstico de câncer de mama em até 2 anos da determinação dos níveis de Cy foram excluídas da análise, os autores observaram uma perda de significância estatística entre a relação dos níveis elevados de Cy e o risco para câncer de mama. Durante este período, tumores subclínicos poderiam estar contribuindo para a elevação dos níveis de Cy e influenciando o resultado do estudo.<sup>(84, 88-90)</sup>

Nosso estudo encontrou uma correlação direta significativa entre os níveis destes dois aminoácidos e suas variações. Provavelmente, pela

contribuição multifatorial representada pelo tumor (como a massa tumoral e o processo inflamatório associado) já clinicamente estabelecido, e o fato desta relação se manter apesar do emprego da terapia, favorece ainda mais a hipótese que os níveis destes metabólitos estão sob forte influência do processo patológico neoplásico.

Outra observação importante é que ocorreram diferentes comportamentos dos metabólitos tanto em relação ao uso anastrozol quanto para o uso do tamoxifeno ou mesmo do placebo, ou seja, observamos que alguns pacientes que receberam o mesmo medicamento apresentaram aumento dos níveis séricos destes metabólitos enquanto outros apresentaram queda dos mesmos. A contribuição relativa do efeito direto das medicações sobre a variação dos níveis dos aminoácidos não foi estatisticamente relevante em nosso estudo, como pudemos observar na tabela 14.

Apesar da possibilidade do efeito direto dos medicamentos sobre os níveis da Hcy, o que parece ter influenciado o comportamento destes metabólitos, de maneira preponderante, foi a extensão da doença em si. Como vimos, as reduções significativas da Hcy e Cy ocorreram nas pacientes de estadiamento clínico mais avançado (IIIA e IIIB).<sup>(257)</sup> É importante salientar que o estadiamento clínico é um dado que sintetiza uma série de características tumorais como extensão da neoplasia e seu padrão de disseminação. Em um estudo com pacientes com carcinoma espinocelular primário de cabeça e pescoço (HNSCC), e que não receberam tratamento, não foram observadas correlações entre os níveis Folato, vitamina B12 e Hcy e a progressão da doença, sugerindo que a diferença entre os níveis Hcy e Cy e progressão podem ser específicos para diferentes tipos tumorais.<sup>(258)</sup>

A idade avançada é considerada um fator de risco para Hiperhomocisteinemia.<sup>(259)</sup> Para a nossa população, não houve correlação entre a idade das pacientes e os níveis plasmáticos de homocisteína ao diagnóstico.

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético bem estudado, envolvido no controle da expressão gênica.<sup>(260)</sup> Alterações nos níveis de Hcy podem resultar em mudanças nas concentrações celulares de S-AdenosilMetionina (SAM) e conseqüentemente promover alterações do padrão

de metilação do DNA.<sup>(91)</sup> Soares e colaboradores já demonstraram a importância da hipometilação como um evento epigenético envolvido na tumorigênese do tecido mamário.<sup>(162)</sup>

Com relação a Cy, uma correlação inversa entre os níveis iniciais de Cy e taxa de metilação global inicial dos tumores se mostrou estatisticamente significativa. Este resultado é interessante e esperado, uma vez que existe uma correlação metabólica entre Hcy, Cy e metilação de DNA no ciclo da Metionina.<sup>(261)</sup>

Embora não tenhamos observado qualquer correlação entre o tamanho do tumor e os níveis de metilação global do tumor, observamos correlação inversa entre variação da Hcy ( $\Delta$ Hcy) e a variação da metilação na amostra tumoral ( $\Delta$ Met T), embora esta relação não tenha se provado estatisticamente relevante. Estes parâmetros podem ser influenciados, também, por alguns fatores como a dieta, polimorfismo das enzimas envolvidas no metabolismo da Metionina, o efeito direto de dois medicamentos diferentes (Anastrozol e Tamoxifeno) e, também, de forma importante, a metodologia utilizada para avaliação da taxa de metilação. Técnicas desenvolvidas com a utilização de enzimas de restrição sensíveis à metilação requerem quantidades significativas de DNA íntegro de boa qualidade para resultados adequados. Outra questão importante é que estes ensaios são limitados pelo número de dinucleotídeos de CpG que podem ser analisados, pois apenas aqueles sítios de CpG que estiverem presentes nas sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição sensíveis à metilação poderiam ser analisados, além de possibilidade de clivagem incompleta pelas enzimas.<sup>(262)</sup>

Até a presente data, existe pouca informação disponível a respeito do papel da Hcy na biologia do tumor. Jennifer Lin, Shumin M. Zhang e colaboradores avaliaram a relação entre os níveis de Hcy e Cy e risco para o desenvolvimento de tumores de mama. Alguns estudos observaram que aumento no risco de câncer estava associado com altos níveis de Hcy ou Cy em mulheres com baixos níveis de Folato.<sup>(73,84)</sup> Altos níveis plasmáticos de Hcy foram também observados em pacientes com outros tipos de câncer.<sup>(84,263-267)</sup> Embora a maioria dos autores tenha analisado os níveis da Hcy e outros componentes do ciclo da metionina como fatores de risco para o

desenvolvimento de câncer, apenas poucos estudos discutem o possível papel da Hcy como fator prognóstico. Bobe e colaboradores observaram que altas concentrações de Hcy estavam associadas com recorrência de adenoma colorretal. Nenhum estudo correlacionando Hcy e prognóstico em câncer de mama foi encontrado.<sup>(264)</sup>

Foi também estudado a relação das concentrações da Hcy e/ou Cy com os níveis de metilação global, para avaliar possíveis mecanismos biológicos por trás desta associação, não conseguimos demonstrar correlações significativas neste estudo, única exceção para correlação inversa observada entre os níveis iniciais de Cy e taxa de metilação global inicial dos tumores. Dado que também corrobora a hipótese de que é a Cy que esta mais relacionada ao processo patológico tumoral. Para checar o possível valor prognóstico e preditivo da Hcy e/ou da Cy, avaliamos pacientes com tumores de mama ressecáveis, seguidas por um período de 4 a 7 anos. Devido ao pequeno número de eventos fatais, o estudo não teve poder estatístico para determinar a contribuição destes aminoácidos na Sobrevida Global.

No entanto, dados significantes na análise univariada apontaram para influência do estadiamento clínico, status dos linfonodos e, de maneira interessante, a variação da Hcy ( $\Delta$ Hcy) na Sobrevida Livre de Doença. A análise multivariada evidenciou que o aumento nos níveis plasmáticos de Homocisteína ( $\Delta$ Hcy positiva) após o regime neoadjuvante de curta duração, aumentava a Sobrevida Livre de Doença ao passo que o comprometimento de um ou mais linfonodos ao diagnóstico aumentava o risco de recidiva do câncer de mama.

Este achado sugere a hipótese que as pacientes que apresentaram elevação nos níveis destes aminoácidos poderiam corresponder à pacientes com tumores que apresentassem maiores níveis de metilação global do genoma, correspondendo portanto, a neoplasias com as vias de sinalização celulares dos receptores hormonais mais íntegras, representando cânceres de mama mais responsivos à terapia hormonal. Estas pacientes apresentariam os desfechos clínicos como sobrevida global e sobrevida livre de doença após maior período de tempo.

Em contrapartida, as pacientes que apresentaram queda dos níveis de Hcy, apresentariam neoplasias com menor grau de metilação global do genoma (genoma mais hipometilado) e, portanto com maior instabilidade cromossômica e alteração das vias de sinalização intracelulares, representando cânceres de mama mais resistentes à endocrinoterapia. Esta hipótese, no entanto, não pôde ser demonstrada em decorrência de algumas limitações técnicas e de número de pacientes randomizadas em cada braço terapêutico. Mas, de uma maneira geral, as variações da Hcy poderiam ser empregadas como um marcador precoce do comportamento tumoral frente ao emprego da endocrinoterapia, tendo seu nível sofrido forte influência dos mecanismos biológicos multifatoriais subjacentes à resposta tumoral frente aos tratamentos empregados.

Este achado sugere que a variação da Hcy possa ser um potencial marcador prognóstico para o tumor de mama, confirmando a associação entre Hcy e prognóstico. Como vimos anteriormente, a análise multivariada mostrou que os níveis de Hcy e o comprometimento dos linfonodos, mas não o tamanho do tumor, representam fatores prognósticos independentes no que diz respeito à Sobrevida Livre de Doença, implicando que a variação nos níveis de Hcy podem ser mais um marcador prognóstico útil na predição de resposta de tratamento em pacientes com tumores de mama.

O tratamento de curta duração com Tamoxifeno e Anastrozol, provavelmente, teve pouca influência na Sobrevida Global ou Sobrevida Livre de Doença. Um estudo da Washington University mostrou que o uso de 4 meses de Tamoxifeno ou Letrozol (outro inibidor de aromatase comparável ao anastrozol) não teve impacto na sobrevida livre de recidiva ou sobrevida atribuída ao câncer.<sup>(268)</sup> Uma meta-análise reunindo 4 estudos comparando Anastrozol ao Tamoxifeno, em regimes de tratamento neoadjuvante com duração de 3 ou 4 meses, detectou uma superioridade do Anastrozol referente à taxa de cirurgias conservadoras, o que não pode ser encontrado em nosso estudo por causa do pequeno número de sujeitos em cada braço terapêutico e pelo tempo curto de exposição das pacientes aos medicamentos (4 semanas).<sup>(269)</sup>

O regime endócrino de curta duração provocou os mais diversos comportamentos nos níveis dos aminoácidos (Hcy e Cy) de acordo com sua ação nas células tumorais. No entanto, devido ao pequeno número de pacientes em cada braço terapêutico e possíveis fatores confundidores como o grau de expressão de receptores hormonais (tanto a expressão de apenas um ou outro receptor, como o próprio nível de expressão avaliado pelo Allred score) e expressão de HER-2 (não revisada no estudo), fatores hoje relacionados ao grau de resposta de tumores de mama à endocrinoterapia, esta aplicação clínica da Hcy não pode ser aqui demonstrada.<sup>(270,271)</sup> Portanto, a utilização da Hcy e também da Cy como fatores preditivos de resposta ao tratamento hormonal também merece especial atenção em investigações futuras.

## 7. CONCLUSÃO

Alto nível de Hcy é um fator de risco cardiovascular bem estabelecido. Além disso, Hcy é um marcador tumoral em potencial. Este é um dos primeiros estudos que avalia o valor das variações da Hcy como marcador prognóstico ou preditivo para câncer de mama. Apesar das limitações deste estudo, análise retrospectiva de um grupo heterogêneo de pacientes, pôde observar, pela primeira vez, o potencial uso da variação da Hcy como um marcador da Sobrevida Livre de Doença em pacientes com câncer de mama. Este achado gera uma hipótese fascinante que deverá ser confirmada em estudos futuros, acrescentando um marcador amplamente disponível e de fácil determinação na prática clínica.



## 8. REFERÊNCIAS

1. World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer (IARC). Peter Boyle and Bernard Levin. WHO Press, World Health Organization.
2. Instituto Nacional de Câncer. Mama. In: Tipos de Câncer. [Acesso em 15 dez 12] Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/>
3. Silva JAG; Ministério de Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de Mama Feminino. In: Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil 2012. Rio de Janeiro. p.: 33-4. [Acesso em 15 dez 12] Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
4. Rakha EA, Lee AHS, Evans AJ, et al. Tubular carcinoma of the breast: further evidence to support its excellent prognosis. *J Clin Oncol.* 2009; 23: 5051.
5. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17: R245-62.
6. Halsted WS. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889 to January, 1894. *Johns Hopkins Hosp Bull.* 1894-1895; 4:297-321.
7. Haagensen CD. *Diseases of the Breast.* Philadelphia: WB Saunders; 1956.
8. Greenough RB. Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J Cancer Res.* 1925; 9:452-63.
9. UICC Committee on Clinical Stage Classification and Applied Statistics. *Clinical stage classification and presentation of results, malignant tumors of the breast and larynx.* Paris: International Union Against Cancer; 1958.
10. Beahrs OH, Carr DT, Rubin P, et al. *Manual for staging of cancer.* Philadelphia: Lippincott; 1977.

11. Singletary E, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(1):37–47.
12. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al; AJCC (American Joint Committee on Cancer). *Cancer staging manual.* 7th edition. New York: Springer-Verlag; 2010.
13. Bland KI, Menck HR, Scott-Conner CE, et al. The national cancer data base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States. *Cancer.* 1998; 83:1262–73.
14. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989; 63(1): 181-7.
15. Adair F, Berg JJ, Robbins G. Long-term follow-up of breast cancer patients: The 30-year report. *Cancer.* 1974; 33: 1145-50.
16. Foster R, Costanza M. Breast self examination practices and breast cancer survival. *Cancer.* 1984; 53: 999-1105.
17. Daly MB, Clark CM, McLoure WL. Breast cancer prognosis in a mixed caucasian-hispanic population. *J Natl Cancer Inst.* 1974; 4: 753-75.
18. Fracchia AA, Robinson D, Lyaspi A, et al. Survival in bilateral breast cancer. *Cancer.* 1985; 55: 1414-21.
19. Pascual MR, Rodriguez M, Zayas A, et al. Factors associated with prognosis in human breast cancer: II. Mutivariate stratification analysis. *Neoplasma.* 1983; 30(4): 485-92.
20. Hartveit F, Thoresen S, Maehle BO. Prognostic evaluation in nodepositive breast carcinoma: stage *versus* growth rate. *Br J Surg.* 1984; 71(6): 463-5.
21. Ketterhagen JP, Quackenbush SR, Haushalter RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet.* 1984; 158:120-3.
22. Coulson PB, Thornthwaite JT, Woolley TW, et al. Prognostic indicators including DNA hitogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res.* 1984; 44: 4187-96.

**23.** Peterson AHG, Zuck VP, Szafran O, et al. Influence and significance of certain prognostic factors on survival in breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1982; 18: 937-43.

**24.** Carter D, Pipkin RD, Shepard RH, et al. Relationship of necrosis and tumor border to lymph node metastases and 10-year survival in carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol.* 1978; 2: 39-46.

**25.** Blamey RW, Davies CJ, Elston CW, et al. Prognostic factors in breast cancer: The formation of a prognostic index. *Clin Oncol.* 1979; 5: 227-36.

**26.** Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, et al. Predictors of recurrence in stage I (T1N0M0) breast carcinoma. *Ann Surg.* 1981; 193: 15-25.

**27.** Wallgren A, Silfversward C, Eklund G. Prognostic factors in mammary carcinoma. *Acta Radio Ther Phys Biol.* 1976; 15(1): 1-16.

**28.** Atkinson EN, Brown BW, Montague ED. Tumor volume, nodal status, and metastasis in breast cancer in women. *J Natl Cancer Inst.* 1986; 76(2): 171-8.

**29.** Freedman LS, Edwards DN, McConnell EM, et al. Histological grade and other prognostic factors in relation to survival of patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 1979; 40: 44-55.

**30.** Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *Oncologist.* 2004; 9(6): 606-16

**31.** NHS Cancer Screening Programmes jointly with The Royal College of Pathologists(UK). Pathology reporting of breast disease: a joint document incorporating the third edition of the NHS breast screening programme's guidelines for pathology reporting in breast cancer screening and the second edition of the Royal College of Pathologists' minimum dataset for breast cancer histopathology. Wakefield: Charlesworth, 2005

**32.** Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow up. *Histopathology.* 1991; 19: 403–10.

**33.** Denley H, Pinder SE, Elston CW, et al. Preoperative assessment of prognostic factors in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 20–4

34. Blamey RW, Ellisa IO, Pindera SE, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990–1999. *Eur J Cancer*. 2007; 43(10): 1548-55.
35. Blamey RW. Estimation of prognosis of the individual with primary breast cancer and its applications. *Scand J Surg*. 2002; 91(3): 273-8.
36. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, et al. A Prognostic Index in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1982; 45: 361–6.
37. Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol*. 1988; 6: 1076-87.
38. Parl FF, Schmidt BP, Dupont WD, et al. Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. *Cancer*. 1984; 54: 2237-42.
39. Crowe JP Jr, Gordon NH, Hubay CA, et al. Estrogen receptor determination and long term survival of patients with carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet*. 1991; 173: 273-8.
40. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Hormone receptors as prognostic factors in female breast cancer. *Ann Med*. 1991; 23: 643-8.
41. Lethaby AE, Mason BH, Harvey VJ, et al. Survival of women with node negative breast cancer in the Auckland region. *N Z Med J*. 1996; 109: 330-3.
42. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, et al. Early breast cancer. *Lancet*. 2009; 373(9673): 1463-79.
43. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, et al. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17(5): 1474–81.
44. Barnes DM, Millis RR, Gillett CE, et al. The interaction of oestrogen receptor status and pathological features with adjuvant treatment in relation to survival in patients with operable breast cancer: a retrospective study of 2660 patients. *Endocr Relat Cancer*. 2004; 11(1): 85-96.

**45.** Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG, et al.; International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98(21): 1571-81.

**46.** Viale G, Regan MM, Maiorano E, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing Letrozole and Tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J Clin Oncol.* 2007; 25(25): 3846-52.

**47.** Osborne CK. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1609-18.

**48.** Allred DC, Carlson RW, Berry DA, et al. NCCN Task Force Report: estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry journal of the National Comprehensive Cancer Network. Cold Spring Harbor: Cold Spring Publishing; 2009.

**49.** Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA 3rd, et al. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer.* 1980; 46: S2884-8.

**50.** Knight WA 3rd, Osborne CK, McGuire WL. Hormone receptors in primary and advanced breast cancer. *Clin Endocrinol Metab.* 1980; 9: 361-8.

**51.** Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(16): 2784-95.

**52.** Kiani J, Khan A, Khawar H, et al. Estrogen receptor alpha-negative and progesterone receptor-positive breast cancer: lab error or real entity? *Pathol Oncol Res.* 2006; 12: 223-7

**53.** Yu KD, Di GH, Wu J, et al. Breast cancer patients with estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive tumors: being younger and getting less benefit from adjuvant tamoxifen treatment. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2008; 134(12): 1347-54.

**54.** Bernoux A, de Cremoux P, Laine-Bidron C, et al. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer:

pathological characteristics and clinical outcome. Institut Curie Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 49: 219–25.

**55.** Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, et al. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer.* 2005; 103: 2241–51.

**56.** Borrás M, Lacroix M, Legros N, et al. Estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive Evsa-T mammary tumor cells: a model for assessing the biological property of this peculiar phenotype of breast cancers. *Cancer Lett.* 1997; 120: 23–30.

**57.** Cui X, SchiV R, Arpino G, et al. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7721–35.

**58.** Bezwoda WR, Esser JD, Dansey R, et al. The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. *Cancer.* 1991; 68: 867–72.

**59.** Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 51: 227–38.

**60.** Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med.* 2009; 360(8): 790-800.

**61.** Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000; 406: 747-52.

**62.** Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 98(19): 10869-74.

**63.** Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 8418-23.

**64.** Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 10393-8.

- 65.** Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006; 7: 96.
- 66.** Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 5678-85.
- 67.** van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415: 530-6.
- 68.** Buyse M, Loi S, van't Veer L, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98: 1183-92.
- 69.** Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen- treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2817-26.
- 70.** Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 5287-312.
- 71.** Bueno-de-Mesquita JM, van Harten WH, Retel VP, et al. Use of 70-gene signature to predict prognosis of patients with node-negative breast cancer: a prospective community-based feasibility study (RASTER). *Lancet Oncol*. 2007; 8: 1079-87. Errata em: *Lancet Oncol*. 2008; 9: 10.
- 72.** Lazzerini PE, Capecchi PL, Selvi E, et al: Hyperhomocysteinemia, inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2007; 6: 503-9.
- 73.** Zhang SM, Willett WC, Selhub J, et al. Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(5): 373-80.
- 74.** McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol*. 1969; 56(1): 111–28.
- 75.** McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 21 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
- 76.** Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.

**77.** Jardine MJ, Kang A, Zoungas S, et al. The effect of folic acid based homocysteine lowering on cardiovascular events in people with kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012; 344: E3533.

**78.** Gatt A, Makris A, Cladd H, et al. Hyperhomocysteinemia in women with advanced breast cancer. *Int J Lab Hematol*. 2007; 29(6): 421-5.

**79.** Feng L, Isaac V, Sim S, et al. Associations between elevated homocysteine, cognitive impairment, and reduced white matter volume in healthy old adults. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2013; 21(2): 164-72.

**80.** Phelip JM, Ducros V, Faucheron JL, et al. Association of hyperhomocysteinemia and folate deficiency with colon tumors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 14: 242-8.

**81.** Wakkee M, Thio HB, Prens EP, et al. Unfavorable cardiovascular risk profiles in untreated and treated psoriasis patients. *Atherosclerosis*. 2007; 190: 1-9.

**82.** Wu JT. Circulating homocysteine is an inflammation marker and a risk factor of life-threatening inflammatory diseases. *J Biomed Lab Sci*. 2007; 19(4): 107-12.

**83.** Sun CF, Haven TR, Wu TL, et al. Serum total homocysteine increases with the rapid proliferation rate of tumor cells and decline upon cell death: a potential new tumor marker. *Clinica Chimica Acta*. 2002; 321(1-2): 55-62.

**84.** Lin J, Lee M, Song Y, et al. Plasma homocysteine and cysteine and risk of breast cancer in women. *Cancer Res*. 2010; 70(6): 2397-405.

**85.** Wu LL, Wu JT. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clinica Chimica Acta*. 2002; 322(1-2): 21-8.

**86.** Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost*. 2000; 26(3): 219-25.

**87.** Hoffman DR, Marion DW, Cornatzer WE, et al. S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine metabolism in isolated liver. *J Biol Chem*. 1980; 255(22): 10822-7.

**88.** Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990; 1(5): 228-37.



- 89.** Palmer JL, Abeles RH. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem.* 1979; 254(4): 1217-26.
- 90.** Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998; 157: S40-4.
- 91.** Yi P, Melnyk S, Pogribna M, et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem.* 2000; 275(38): 29318-23.
- 92.** Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(4): 511-9.
- 93.** Bailey LB. Folate in health and disease. 2 ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francys Group; 2010.
- 94.** James SJ, Melnyk S, Pogribna M, et al. Elevation in S-Adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. *Nutr.* 2002; 132: S2361-6.
- 95.** Hu Y, Komoto J, Gomi T, et al. Crystal structure of S-adenosylhomocysteine from rat liver. *Biochemistry.* 1999; 38: 8323-33.
- 96.** Hoffman DR, Cornatzer WE, Duerre JA. Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem.* 1979; 57: 56-65.
- 97.** Cox R, Prescott C, Irving CC. The effect of S-adenosylhomocysteine on the DNA methylation in isolated rat liver nuclei. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 474(4): 493-9.
- 98.** De Cabo SF, Santos J, Fernandez-Piqueras J. Molecular and cytological evidence of S-adenosyl-L-homocysteine as an innocuous undermethylation agent in vivo. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; 71(2): 187-92.
- 99.** Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther.* 1998; 77(2): 115-34.
- 100.** Dizik M, Christman JK, Wainfan E. Alterations in expression and methylation of specific genes in livers of rats fed a cancer promoting methyl-deficient diet. *Carcinogenesis.* 1991; 12(7): 1307-12.

**101.** Pogribny IP, Miller B J, James SJ. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett.* 1997; 115(1): 31-8.

**102.** Russo VEA, Martienssen RA, Rigs AD. Epigenetic mechanisms of gene regulation. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview;1996.

**103.** Tim CR, Ulrike A. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur J Cell Biol.* 2005; 84: 123-35.

**104.** Strathdee G, Simand A, Brown R. Control of gene expression by CpG island methylation in normal cells. *Biochem Soc Trans.* 2004; 32: 913-5.

**105.** Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* 1992; 11(7): 2611-17.

**106.** Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferase Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.*1999; 99(3): 247-57.

**107.** Lyko F, et al. Mammalian (Cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. *Nature Genet.* 1999; 23(3): 363-6.

**108.** Hsieh CL. In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(12): 8211-18.

**109.** Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(26): 16916-21.

**110.** Dong A, Yoder JA, Zhang X, et al. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(2): 439-48.

**111.** Aapola U, Kawasaki K, Scott HS, et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics.* 2000; 65 (3): 293-8.

**112.** Sinkkonen L, Huggenschmidt T, Berninger P, et al. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15(3): 259-67.

**113.** Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB. The cancer epigenome-components and functional correlates. *Genes Dev.* 2006; 20: 3215-31.

**114.** Meehan RR, Lewis JD, McKay S, et al. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell.* 1989; 58(3): 499-507.

**115.** Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(10): 1509-22.

**116.** Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2): 187-91.

**117.** Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2003; 278(6): 4035-40.

**118.** Kimura H, Shiota K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem.* 2003; 278(7): 4806-12.

**119.** Sarraf AS, Stancheva I. Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell.* 2004; 15(4): 595-605.

**120.** Korkmaz A , Barcelo EJS, Tan DX, et al. Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 115 (1): 13-27.

**121.** Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development- review. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(9): 662-72.

**122.** Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and Breast Cancer. *Pharmacogenomics.* 2008; 9(12): 1879-902.

**123.** Stipanuk MH. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24: 539-77.

**124.** Faintuch J, Aguilar PB, Nadalin W. Relevance of N-acetylcysteine in clinical practice: fact, myth or consequence? *Nutrition.* 1999; 15(2): 177-9.

- 125.** Droge W. Cysteine and glutathione deficiency in AIDS patients: a rationale for the treatment with N-acetyl-cysteine. *Pharmacology*. 1993; 46(2): 61-5.
- 126.** Stipanuk MH, Ueki I, Dominy JE Jr, et al . Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino Acids*. 2009; 37(1): 55-63.
- 127.** Stipanuk MH, Dominy JE Jr, Lee JI, et al. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism. *J Nutr*. 2006; 136: S1652-9.
- 128.** Dudman NP, Hicks C, Wang J, et al. Human arterial endothelial cell detachment in vitro: its promotion by homocysteine and cysteine. *Atherosclerosis*. 1991; 91(1-2): 77-83.
- 129.** Hogg N. The effect of cyst(e)ine on the auto-oxidation of homocysteine. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(1-2): 28-33.
- 130.** Saez G, Thornalley PJ, Hill HA, et al. The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effect on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 719(1): 24-31.
- 131.** Andie P, Orwar O, Jacobson I, et al. Extracellular acidic sulfur-containing amino acids and  $\gamma$ -glutamyl peptides in global ischemia: postschemic recovery of neuronal activity is paralleled by tetrodotoxin-sensitive increase in cysteine sulfinate in the CA1 of the rat hippocampus. *J Neurochem*. 1991; 57(1): 230-6.
- 132.** Lehmann A, Hagberg H, Orwar O, et al. Cysteine sulphinate and cysteate: mediators of cysteine toxicity in the neonatal rat brain? *Eur J Neurosci*. 1993; 5: 1938-412.
- 133.** Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res*. 1985; 32: 115-54.
- 134.** Park S, Imlay JA. High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction *J Bacteriol*. 2003; 185(6): 1942–50.
- 135.** Cantoni GL. The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine. *Prog Clin Biol Res*. 1985; 198: 47-65.

- 136.** Chiang PK. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther.* 1998; 77 (2) : 115-34.
- 137.** Medina MA, Urnov FD, Amores-Sanchez E. Roles of homocysteine in cell metabolism. *Eur J Biochem.* 2001; 268(14): 3871-82.
- 138.** Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007; 8: 286-98.
- 139.** Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358(11): 1148-59.
- 140.** Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer.* 2000; 36(18): 2294–300.
- 141.** Jacinto FV, Esteller M. Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis.* 2007; 22(4): 247–53.
- 142.** Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998; 393 (6683): 386-9.
- 143.** Steenken S. Addition-elimination paths in electrontransfer reactions between radicals and molecules. *J Chem Soc Faraday Trans.* 1987; 83(1): 113-24.
- 144.** Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol.* 1987; 51(4): 573-89.
- 145.** Dizdaroglu, M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res.* 1992; 275(3-4): 331-42.
- 146.** Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 1033-77.
- 147.** Mitchell AR. Hypomethylation of human heterochromatin detected by restriction enzyme nick translation. *Exp Cell Res.* 1992; 202(1): 203-6.
- 148.** Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, et al. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl deficient rats. *Cancer Res.* 1995; 55(9):1894-901.
- 149.** Li JC, Kaminskas E. Accumulation of DNA strand breaks and methotrexate cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81(18): 5694-8.

**150.** Kruman II, Culmsee C, Chan SL, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci.* 2000; 20(18): 6920-6.

**151.** Ratter F, Germer M, Fischbach T, et al. S-Adenosylhomocysteine as physiological modulator of Apo-1-mediated apoptosis. *Int Immunol.* 1996; 8(7): 1139-47.

**152.** James SJ, Miller BJ, Basnakian AG, et al. Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats. *Carcinogenesis.* 1997; 18(2): 287-93.

**153.** Halsted CH, Villanueva J, Chandler CJ, et al. Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. *Hepatology.* 1996; 23(3): 497-505.

**154.** Bennett MR. Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis. *Circ Res.* 2001; 88(7): 648-50.

**155.** Adamec E, Vonsattel JP, Nixon RA. DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1999; 849(1-2): 67-77.

**156.** Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics.* 2002; 3(6): 415-28.

**157.** Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2007; 1775(1): 138-62.

**158.** Dunn BK. Hypomethylation: one side of a larger picture. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2003; 983(1): 28-42.

**159.** Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002; 21(35): 5400-13.

**160.** Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics.* 2006; 7(1): 21-33.

**161.** Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer.* 2004; 4(1): 143-53.

**162.** Soares J, Pinto AE, Cunha CV, et al. Global DNA hypomethylation in breast carcinoma: correlation with prognostic factors and tumor progression. *Cancer.* 1999; 85(1): 112-8.

**163.** Bernardino J, Roux C, Almeida A, et al. DNA hypomethylation in breast cancer: an independent parameter of tumor progression? *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1997; 97(2): 83-9.

**164.** Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Research*. 1983; 11(19): 6883-94.

**165.** Jackson K, Yu MC, Arakawa K, et al. DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 2004; 3(12): 1225-31.

**166.** Esteller M, Fraga MF, Guo M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Human Molecular Genetics*. 2001; 10(26): 3001-7.

**167.** Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. 1983; 301(5895): 89-92.

**168.** Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975; 187(4173): 226-32.

**169.** Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003; 300(5618): 489-92.

**170.** Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001; 20(24): 3139-55.

**171.** Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*. 2002; 21(35): 5380-7.

**172.** Karpf AR, Matsui S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Research*. 2005; 65(19): 8635-9.

**173.** National Institutes of Health(US). Adjuvant therapy for breast cancer. NIH Consensus Statement [Internet]. 2000 Nov 1-3 [acesso em 2013 Jan 15]; 17(4): 1-23. Disponível em: <http://consensus.nih.gov/2000/2000AdjuvantTherapyBreastCancer114html.htm>

**174.** Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347(16): 1227-32.

**175.** Murthy V, Hamberlain RS. Nipple-sparing mastectomy in modern breast practice. *Clin Anat*. 2013; 26(1): 56-65.

**176.** Fisher B. Sounding board. Breast-cancer management: Alternatives to radical mastectomy. *N Engl J Med*. 1979; 301: 326–328.

**177.** Fisher B, Anderson S, Bryant J, et al. Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1233–41.

**178.** Clarke M, Collins R, Darby S, et al; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 366(9503): 2087-106.

**179.** Darby SC, Ewertz M, McGale P, et al. Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2013; 368: 987-98.

**180.** Tokin C, Weiss A, Wang-Rodriguez J, et al. Oncologic safety of skin-sparing and nipple-sparing mastectomy: a discussion and review of the literature. *Int J Surg Oncol*. 2012; 2012: 921821.

**181.** Giordano SH. Update on Locally Advanced Breast Cancer. *Oncologist*. 2003; 8(6): 521-30.

**182.** Vilarino-Varela M, Chin YS, Makris A. Current indications for post-mastectomy radiation. *Int Semin Surg Oncol*. 2009; 6(5): 1-4.

**183.** Graham MA, Riley RJ, Kerr DJ. Drug metabolism in carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther*. 1991; 51: 275-89.

**184.** Levin MN, Whelan T. Adjuvant chemotherapy for breast cancer — 30 years later. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1920-22.

**185.** Lewis JP. An Interpretation of the EBCTCG Data. *Oncologist*. 2007; 12(5): 505-9.

**186.** Swain SM, Sorace RA, Bagley CS, et al. Neoadjuvant chemotherapy in the combined modality approach of locally advanced nonmetastatic breast cancer. *Cancer Res*. 1987; 47: 3889–94.



**187.** Hortobágyi GN, Blumenschein GR, Spanos W, et al. Multimodal treatment of locoregionally advanced breast cancer. *Cancer*. 1983; 51: 763–768.

**188.** Powles TJ, Hickish TF, Makris A, et al. Randomized trial of chemoendocrine therapy started before or after surgery for treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1995; 13: 547–52.

**189.** Fisher B, Bryant J, Wolmark N, et al. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2672–85.

**190.** Semiglazov VF, Topuzov EE, Bavli JL, et al. Primary (neoadjuvant) chemotherapy and radiotherapy compared with primary radiotherapy alone in stage IIb-IIIa breast cancer. *Ann Oncol*. 1994; 5: 591–5.

**191.** van der Hage JA, van de Velde CJ, Julien JP, et al. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 4224–37.

**192.** Perloff M, Lesnick GJ, Korzun A, et al. Combination chemotherapy with mastectomy or radiotherapy for stage III breast carcinoma: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 1988; 6: 261–9.

**193.** Hortobágyi GN, Ames FC, Buzdar AU, et al. Management of stage III primary breast cancer with primary chemotherapy, surgery, and radiation therapy. *Cancer*. 1988; 62: 2507–16.

**194.** Bonadonna G, Veronesi U, Brambilla C, et al. Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82: 1539–45.

**195.** Jacquillat C, Baillet F, Weil M, et al. Results of a conservative treatment combining induction (neoadjuvant) and consolidation chemotherapy, hormonotherapy, and external and interstitial irradiation in 98 patients with locally advanced breast cancer (IIIA-IIIB). *Cancer* 1988; 61: 1977–82.

**196.** Pierce LJ, Lippman M, Ben-Baruch N, et al. The effect of systemic therapy on local-regional control in locally advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 23: 949–60.

**197.** Schwartz GF, Birchansky CA, Komarnicky LT, et al. Induction chemotherapy followed by breast conservation for locally advanced carcinoma of the breast. *Cancer*. 1994; 73: 362–9.

**198.** Fisher B, Brown A, Mamounas E, et al. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Clin Oncol*. 1997; 15: 2483–93.

**199.** Mathew J, Asgeirsson KS, Cheung KL, et al. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: a review of the literature and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2009; 35(2): 113-22.

**200.** Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 460–9.

**201.** Darb-Esfahani S, Loibl S, Müller BM, et al. Identification of biology-based breast cancer types with distinct predictive and prognostic features: role of steroid hormone and HER2 receptor expression in patients treated with neoadjuvant anthracycline/taxane-based chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2009; 11(5): R69.

**202.** Howell A, Dowsett M. Recent advances in endocrine therapy of breast cancer. *BMJ*. 1997;315:863-6.

**203.** Beatson GT. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* .1896; 2: 104-7.

**204.** Jordan VC. Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison: University of Wisconsin Press; 1994: 3-26.

**205.** Osborne CK, Elledge RM, Fuqua SAW. Estrogen receptors in breast cancer therapy. *Sci Med*. 1996; 3: 32-41.

**206.** Lippman ME, Dickson RB. Regulatory mechanisms in breast cancer: advances in cellular and molecular biology of breast cancer. Boston: Kluwer Academic;1991: 289-304.

- 207.** Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, et al. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer*. 1997; 72: 608-13.
- 208.** The Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998; 351: 1451-67.
- 209.** Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2431-42
- 210.** Williams JK, Wagner JD, Li Z, et al. Tamoxifen inhibits arterial accumulation of LDL degradation products and progression of coronary artery atherosclerosis in monkeys. *Arterioscler ThrombVasc Biol*. 1997; 17: 403-8.
- 211.** Love RR, Mazess RB, Barden HS, et al. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med*. 1992; 326: 852-6.
- 212.** Kristensen B, Ejlersen B, Dalgaard P, et al. Tamoxifen and bone metabolism in postmenopausal low-risk breast cancer patients: a randomized study. *J Clin Oncol*. 1994; 12: 992-7.
- 213.** Fisher B, Costantino J, Redmond C, et al. A randomized clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumors. *N Engl J Med*. 1989; 320: 479-84.
- 214.** Fisher B, Dignam J, Bryant J, et al. Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88: 1529-42.
- 215.** Love RR, Cameron L, Connell BL, et al. Symptoms associated with tamoxifen treatment in postmenopausal women. *Arch Intern Med*. 1991; 151: 1842-7.
- 216.** The Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group. A Comparison of Letrozole and Tamoxifen in Postmenopausal Women with Early Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353: 2747-57
- 217.** Miller WR, Hawkins RA, Forrest AP. Significance of aromatase activity in human breast cancer. *Cancer Res*. 1982; 42: S3365-68.

**218.** Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 45: S116-24.

**219.** Longcope C, Baker R, Johnston CC Jr. Androgen and estrogen metabolism: relationship to obesity. *Metabolism.* 1986; 35: 235-7.

**220.** Thijssen JH, Blankenstein MA. Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989; 25: 1953-9.

**221.** Sinha S, Kasetta J, Santner SJ, et al. Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 48: 45-51.

**222.** Santen RJ, Samojlik E, Lipton A, et al. Kinetic, hormonal and clinical studies with aminoglutethimide in breast cancer. *Cancer.* 1977; 39: S2948-58.

**223.** Smith IE, Fitzharris BM, McKinna JA, et al. Aminoglutethimide in treatment of metastatic breast carcinoma. *Lancet.* 1978; 2: 646-9.

**224.** Santen RJ, Santner S, Davis B, et al. Aminoglutethimide inhibits extraglandular estrogen production in postmenopausal women with breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978; 47: 1257-65.

**225.** Stuart-Harris R, Dowsett M, Bozek T, et al. Low-dose aminoglutethimide in treatment of advanced breast cancer. *Lancet.* 1984; 2: 604-7.

**226.** Mouridsen H, Gershanovich M, Sun Y, et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the International Letrozole Breast Cancer Group. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 2596-606. Errata em: *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3302.

**227.** Nabholz JM, Buzdar A, Pollak M, et al. Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast carcinoma in postmenopausal women: results of a North American multicenter randomized trial. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 3758-67.

**228.** Bonnetterre J, Thurlimann B, Robertson JFR, et al. Anastrozole versus tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in 668

postmenopausal women: results of the Tamoxifen or Arimidex Randomized Group Efficacy and Tolerability study. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 3748-57.

**229.** Eiermann W, Paepke S, Appfelstaedt J, et al. Preoperative treatment of postmenopausal breast cancer patients with letrozole: a randomized double-blind multicenter study. *Ann Oncol*. 2001; 12: 1527-32.

**230.** ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomized trial. *Lancet*. 2002; 359: 2131-9. Errata em: *Lancet*. 2002; 360: 1520.

**231.** Carlini P, Bria E, Giannarelli D, et al. Aromatase inhibitors in postmenopausal metastatic breast carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(7): 1023-36.

**232.** Guisado AM, Muñoz AS, Garrido MCL, et al. Initialization of adjuvant hormonal treatment for breast cancer. 2011; 28: S66-84.

**233.** A. Jones. Combining trastuzumab (Herceptin®) with hormonal therapy in breast cancer: what can be expected and why? *Annals of Oncology*. 2003; 14: 1697–704.

**234.** Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.

**235.** Harries M, Smith I. The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer*. 2002; 9: 75–85.

**236.** Coutant C, Rouzier R, Qi Y, et al. Distinct p53 gene signatures are needed to predict prognosis and response to chemotherapy in ER-positive and ER-negative breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2011. [Acesso em: 20 fev 2011] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248301>

**237.** Dworkin AM, Huang THM, Toland AE. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(3):165-71.

**238.** Choi SW, Kim YI, Weitzel JN, et al. Folate depletion impairs DNA excision repair in the colon of the rat. *Gut*. 1998; 43(1): 93–9.

**239.** Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem*. 1999; 45(2): 290-2.

- 240.** Nunes EC, D`Almeida V, Cardieri LC, et al. Standardization of homocysteine determination by high pressure liquid chromatography and application on coronary artery disease patients. *J Bras Patol.* 2000; 36: 166-73.
- 241.** Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. *AJCC Cancer Staging Manual.* 6 ed. New York: Springer-Verlag; 2002.
- 242.** Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistic.* Oxford: Blackwell Publishing Limited; 2006.
- 243.** Kleinbaum DG, Klein M. *Statistics for Biology and Health. Survival Analysis, Series: Statistics for Biology and Health.* New York: Springer; 2005.
- 244.** Ierardi DF, Raimundo LG, Aguiar G, et al. Homocysteine as a Biomarker for Predicting Disease-Free Survival in Breast Cancer. *ABCR.* 2013; 2(2): 24-31.
- 245.** Baum M, Budzar AU, Cuzick J, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet.* 2002; 360: 1520.
- 246.** Macaskill EJ, Renshaw L, Dixon JM. Neoadjuvant use of hormonal therapy in elderly patients with early or locally advanced hormone receptor-positive breast cancer. *Oncologist.* 2006; 11(10): 1081-1088
- 247.** Colleoni M, Viale G, Goldhirsch A. Lessons on responsiveness to adjuvant systemic therapies learned from the neoadjuvant setting. *Breast.* 2009; 18: S137-40.
- 248.** Mattar A, Logullo AF, Facina G, et al. Short-term anastrozole therapy reduces Ki-67 and progesterone receptor expression in invasive breast cancer: a prospective, placebo-controlled, double-blind trial. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137: 897–905.
- 249.** Freedman OC, Verma S, Clemons MJ. Using aromatase inhibitors in the neoadjuvant setting: evolution or revolution? *Cancer Treat Rev.* 2005; 31(1): 1-17.
- 250.** Ellis MJ, Ma C. Letrozole in the neoadjuvant setting: the P024 trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 105: S33-43.

- 251.** Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, et al. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med.* 2006; 354(15): 1567-77.
- 252.** Brooks M. Breast cancer screening and biomarkers. *Methods Mol Biol.* 2009; 472: 307-21.
- 253.** Wright T, McGechan A. Breast cancer: new technologies for risk assessment and diagnosis. *Mol Diagn.* 2003; 7(1): 49-55.
- 254.** Corless CL. Medicine. Personalized cancer diagnostics. *Science.* 2011; 334: 1217-8.
- 255.** Jacobsen D. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem.* 1998; 44: 1833– 43.
- 256.** Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem.* 1995; 41: 340–342.
- 257.** Cattaneo M, Baglietto L, Zighetti ML, et al. Tamoxifen reduces plasma homocysteine levels in healthy women. *Br J Cancer.* 1998; 77(12): 2264-6.
- 258.** Almadori G, Bussu F, Galli J, et al. Serum levels of folate, homocysteine, and vitamin B12 in head and neck squamous cell carcinoma and in laryngeal leukoplakia. *Cancer.* 2005; 103: 284-92.
- 259.** Naurath HJ. Hyperhomocysteinemia in advanced age. *Clin Chem Lab Med.* 2001; 39(8): 695-7.
- 260.** Esteller M, Almouzni G. How epigenetics integrates nuclear functions. *Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. EMBO Rep.* 2005; 6(7): 624-8.
- 261.** Sharma P, Senthilkumar RD, Brahmachari V, et al. Mining literature for a comprehensive pathway analysis: a case study for retrieval of homocysteine related genes for genetic and epigenetic studies. *Lipids Health Dis.* 2006; 5: 1.
- 262.** Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 253–66.
- 263.** Sciacca FL, Ciusani E, Silvani A, et al. Genetic and plasma markers of venous thromboembolism in patients with high grade glioma. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(4): 1312-7.

**264.** Bobe G, Murphy G, Rogers CJ, et al. Serum adiponectin, leptin, C-peptide, homocysteine, and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19: 1441-52.

**265.** Almadori G, Bussu F, Galli J, et al. Serum folate and homocysteine levels in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2002; 94: 1006-11.

**266.** Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Firat H, et al. Usefulness of homocysteine as a cancer marker: total thiol compounds and folate levels in untreated lung cancer patients. *Anticancer Res.* 2007; 27(2): 1185-9.

**267.** Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, et al. Relationship between homocysteine and neopterin concentrations in patients with gynecological cancer. *Cancer Lett.* 2006; 240(2): 198-202.

**268.** Ellis MJ, Tao Y, Luo J, et al. Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(19): 1380-8.

**269.** Seo JH, Kim YH, Kim JS. Meta-analysis of pre-operative aromatase inhibitor versus tamoxifen in postmenopausal woman with hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009; 63(2): 261-6.

**270.** Ma CX, Sanchez CG, Ellis MJ. Predicting endocrine therapy responsiveness in breast cancer. *Oncology.* 2009; 23(2): 133-42.

**271.** Rastelli F, Crispino S. Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori.* 2008; 94(3): 370-83.



## **Anexo 1: Termo de consentimento CEP nº 1160/04**

### **Termo de Consentimento livre e Esclarecido**

1 – Projeto: Correlação entre dieta e níveis globais de metilação do DNA em carcinomas de mama.

2 – Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa buscar uma correlação entre o nível de ingestão de folato, vitamina B6, vitamina B12 e metionina na dieta e o nível global de metilação do DNA de fragmentos de tumores de mama.

3 – Os procedimentos realizados serão: 1. retirada de um fragmento de biópsia adicional do tumor de mama quando esse procedimento já estiver indicado para o seu caso e posterior análise do nível de metilação do DNA desse material; 2. aplicação de um questionário de frequência alimentar e 3. coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço e posterior dosagem dos níveis plasmáticos de folato, vitamina B6 e B12 e homocisteína;

4 – O desconforto adicional esperado dizem respeito à punção venosa para a coleta do sangue;

5 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Luiz Henrique Gebrim que pode ser encontrado no endereço Rua Botucatu, 527, nos Telefones 55764618 ou 55764100. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br

6 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

11 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Correlação entre níveis de metilação do DNA em carcinomas de mama e dieta".

Eu discuti com o Dr. Luiz Henrique Gebrim sobre a minha decisão em participar nesse estudo. 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 voluntariamente em participar deste 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.

-----

Assinatura do paciente/representante legal Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

-----  
Assinatura da testemunha Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

-----  
Dr. Luiz Henrique Gebrim Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Anexo 2: Termo de consentimento CEP nº 0904/4****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**“Estudo dos efeitos farmacodinâmicos do tamoxifeno e dos inibidores de aromatase (Arimidex<sup>R</sup>) em pacientes com câncer de mama.”**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinada, fui esclarecida sobre o objetivo do presente estudo e eventuais desconfortos que poderei sofrer.

Confirmando ter revisado o conteúdo de informação precedente, relativo ao estudo a que estou concedendo a minha participação por livre e espontânea vontade.

Estou ciente dos propósitos do estudo, dos procedimentos a serem realizados, desconfortos e riscos, vantagens e benefícios, bem como a garantia do sigilo total de minha participação e esclarecimentos permanentes durante a pesquisa. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo, sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

Assinatura da paciente ou representante legal:

\_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

Assinatura \_\_\_\_\_ da  
testemunha: \_\_\_\_\_

Eu, André Mattar, declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido da paciente acima ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador