

ALINE BARROS SANTANA

SORO AMILÓIDE A (SAA) E ADIPONECTINA-  
CARACTERIZAÇÃO NO CÂNCER DE MAMA NA PÓS-  
MENOPAUSA E RELAÇÃO COM OBESIDADE

Campinas

UNICAMP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

SORO AMILÓIDE A (SAA) E ADIPONECTINA-  
CARACTERIZAÇÃO NO CÂNCER DE MAMA NA PÓS-  
MENOPAUSA E RELAÇÃO COM OBESIDADE

ALINE BARROS SANTANA

Dissertação apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas. Sob a orientação de: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia de Barros Mazon

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

Sa59s Santana, Aline Barros, 1979 -  
Soro Amilóde A (SAA) e Adiponectina : caracterização  
no câncer de mama na pós-menopausa e relação com  
obesidade / Aline Barros Santana. -- Campinas, SP :  
[s.n.], 2012.

Orientador : Sílvia de Barros Mazon  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adipocinas. 2. Inflamação. 3. Obesidade  
Abdominal. 4. Menopausa. 5. Câncer de Mama. I.  
Mazon, Sílvia de Barros. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Serum Amyloid A (SAA) and Adiponectin : characterization in  
postmenopausal breast cancer relationship with obesity

**Palavras-chave em inglês:**

Adipokines

Inflammation

Abdominal Obesity

Menopause

Breast Cancer

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Área de concentração:** Ciências Biomédicas

**Banca examinadora:**

Sílvia de Barros Mazon [Orientador]

Ramon Kaneno

Angélica Zaninelli Schreiber

**Data da defesa:** 16-02-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

**Banca examinadora da Dissertação de Mestrado**  
**Aline Barros Santana**

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia de Barros Mazon

**Membros:**

1. Profa. Dra. Sílvia de Barros Mazon - 

2. Prof. Dr. Ramon Kaneno - 

3. Prof. Dr. Angélica Zaninelli Schreiber - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

**Data: 16/02/2012**

## *DEDICATÓRIA*

---

Ao meu esposo,  
Nivaldir Antonio Santana,  
por seu apoio em todos os níveis  
para a concretização deste projeto.

## ***AGRADECIMENTOS***

---

À minha orientadora Profa. Dra. Sílvia de Barros Mazon, pelos ensinamentos e dedicação.

À Profa. Dra. Maria Salete da Costa Gurgel pela colaboração.

À Profa. Dra. Eliana Cotta de Faria pela colaboração.

À Sandra Oliveira de Almeida Teixeira e Ana Carolina Esteves Dias pelo suporte técnico.

À Helymar da Costa Machado e Cleide Aparecida Moreira Silva pelo suporte estatístico.

À Joelma Ferreira de Oliveira Montanari e Flávia Muraro Bonini, pelo apoio na coleta de dados e de material e em especial pela amizade.

À Aline Teotônio Rodrigues e Aline Cruz pela assessoria na formatação, pela competência, paciência e amizade.

Aos funcionários da Seção de Imunologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas - UNICAMP: Alexandre Augusto Camargo Cherubim, Ana Cristina Valença Ferreira de Souza, Andrea Domênica Teodoro da Silva, Janete Inácio Batista, Márcia Luciméia Fernandes Julian, Mariusa Terezinha dos Santos, Odélia Aparecida do Prado, Sandra Oliveira de Almeida Teixeira, Vítor Oliveira de Almeida, Walderez Márcia Gonçalves Volpini.

Aos funcionários do serviço de Enfermagem em Unidade de Internação-Seção Oncologia – CAISM.

Aos funcionários da Divisão de Oncologia: Neuza Aparecida de Melo Balduci, Débora Fernanda Glicério Andrade Fernandes e Sônia Aparecida Pianca, pelo apoio e gentileza.

A todas as pacientes da Unidade de Internação-Seção Oncologia – CAISM, participantes desta pesquisa.

Aos meus pais, Renato e Alice, pela formação necessária para chegar até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX), pelo apoio financeiro.

Aos amigos, pelo ombro amigo que nunca faltou,

Muito Obrigada!

*"Embora ninguém possa voltar atrás e  
fazer um novo começo,  
qualquer um pode começar agora e  
fazer um novo fim"*  
**(Francisco Cândido Xavier)**



***RESUMO***

A obesidade tem aumentado consideravelmente nas últimas cinco décadas em todo mundo. A Organização Mundial de Saúde estima que pessoas com sobrepeso ultrapassem a casa do bilhão e que cerca de 300 milhões sejam obesas. No contexto da inflamação crônica presente na obesidade, as adipocinas SAA e adiponectina, que possuem funções antagônicas, têm demonstrado notável destaque na literatura e ambas também têm sido associadas com o desenvolvimento e prognóstico do câncer de mama. No presente estudo foi investigada a associação entre obesidade, SAA e adiponectina em portadoras de câncer de mama na fase pós-menopausa e suas relações com as características clínico-patológicas dos tumores. Para esta investigação as pacientes participantes do estudo foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo foi composto por mulheres com sobrepeso/obesidade e presença de gordura abdominal e o segundo grupo por mulheres não-obesas, com ausência de gordura abdominal. Os dados encontrados demonstraram que as concentrações séricas de SAA foram maiores em pacientes com sobrepeso/obesidade e que essa elevação foi dependente da obesidade, aqui caracterizada tanto pelo índice de massa corpórea (IMC) quanto pela circunferência abdominal (CA). Concentrações mais elevadas de SAA foram também observadas em portadoras de tumores com ausência de expressão de receptores de estrógeno (RE<sup>-</sup>), do que naquelas com tumores RE<sup>+</sup>. Quanto às concentrações de adiponectina, não foram verificadas associações com o IMC ou CA. Também não foram demonstradas associações entre as concentrações séricas de SAA ou adiponectina com o estadiamento clínico-patológico dos tumores. Os dois grupos apresentaram frequências semelhantes em relação aos diferentes graus de estadiamento clínico-patológico (ECP) e expressão dos receptores hormonais RE e RP. Todavia, observou-se maior frequência do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 humano (HER2<sup>+</sup>) entre os tumores das pacientes não-obesas, sugerindo mecanismo de expressão independente da obesidade. Em relação à frequência de parâmetros bioquímicos alterados, o grupo de não-obesas apresentou maior frequência de colesterol total (Col-T) acima do valor de referência e o grupo com sobrepeso/obesidade mostrou tendência de maior frequência de concentrações alteradas de glicose (Gli). A avaliação da relação das adipocinas com os parâmetros bioquímicos revelou que a SAA mostrou correlação positiva com a Gli e que a adiponectina correlacionou-se inversamente com triglicerídeos (TG) e Gli e diretamente com a lipoproteína de alta densidade (HDL-Col). Nossos resultados permitem aventar a hipótese

de uma possível participação da SAA, no contexto da obesidade, no desenvolvimento do câncer de mama. O acompanhamento desta população, para avaliação da sobrevida total e sobrevida livre de doença poderá contribuir para a elucidação da importância biológica e/ou clínica da SAA e da adiponectina no câncer de mama. Resultados futuros poderão embasar a adoção do tratamento da obesidade como medida preventiva, para proporcionar um melhor prognóstico para as portadoras de câncer de mama com sobrepeso/obesidade.

***ABSTRACT***

Obesity has increased considerably in the last five decades worldwide. According to the World Health Organization (WHO), it is estimated that, globally, there are more than 1 billion overweight adults, and that there are at least 300 million clinically obese. In the context of chronic inflammation present in obesity, SAA and adiponectin are adipokines which have antagonistic functions and both have been associated with the development and prognosis of breast cancer. In the present study we investigated the association among obesity, SAA and adiponectin in women bearing breast cancer in postmenopausal and their relationships with clinical-pathological characteristics of the tumors. For this investigation the patients were grouped as follows: one group by overweight/obese women (presence of abdominal fat) and the second was composed of non-obese women (no abdominal fat). The findings demonstrated that serum SAA concentrations were higher in patients with overweight/obese and this condition was dependent on obesity, here characterized by both the body mass index (BMI) and waist circumference (WC). Concentrations of SAA were also higher in women bearing ER- breast cancer than in ER+ ones. Conversely, adiponectin did not show association with BMI or with WC. There were no associations between serum concentrations of SAA or adiponectin and the clinical-pathological staging of the tumors. SAA showed direct correlation with glucose and adiponectin correlated inversely with triglycerides and glucose e directly with high-density lipoprotein (HDL-Chol). The non-obese group showed a more elevated frequency of abnormal values of total cholesterol, and overweight/obesity group showed a trend of higher frequency of altered glucose concentrations. The expression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2+) was higher among non-obese breast cancer, suggesting an obesity-independent expression mechanism. Our results allow the hypothesis of a possible role for SAA in the development and prognosis of breast cancer in the context of obesity. The follow up of this population to assess overall and disease-free survival may contribute to the elucidation of SAA and adiponectin biological and/or clinical significance in breast cancer. This may support the adoption of treating obesity as a preventive action against the onset as well as to provide better prognosis for overweight/obesity breast cancer patients.

## ***LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS***

---

	<b>Português</b>	<b>Inglês</b>
<b>AdipoR1</b>	receptor para adiponectina-1	adiponectin receptor-1
<b>AdipoR2</b>	receptor para adiponectina-2	adiponectin receptor-2
<b>Col-T</b>	colesterol total	-----
<b>CA</b>	circunferência abdominal	-----
<b>Gli</b>	glicose	-----
<b>HDL-Col</b>	lipoproteína de alta densidade	high-density- lipoproteins
<b>HER2</b>	receptor para fatores de crescimento	human epidermal growth factor receptor 2
<b>IGF</b>	-----	insulin-like growth factor
<b>IMC</b>	índice de massa corpórea	-----
<b>IL-1</b>	ínterleucina-1	-----
<b>IL-6</b>	interleucina-6	-----
<b>LDL-Col</b>	lipoproteína de baixa densidade	low - density lipoprotein
<b>RE</b>	receptor de estrógeno	-----
<b>RP</b>	receptor de progesterona	-----
<b>SAA</b>	soro amilóide-A	-----
<b>SHBG</b>	globulina ligante de hormônio sexual	sex hormone-binding globulin
<b>TG</b>	triglicerídeos	-----
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa	-----
<b>TNM</b>	T: extensão do tumor primário - N:	-----

ausência ou presença e a extensão de  
metástase em linfonodos regionais - M:

ausência ou presença de metástase à  
distância

**TAM** macrófagos associados ao tumor tumor associated macrophages

**VR** valor de referência

## *LISTA DE TABELAS E FIGURAS*

---

ESQUEMA 1: Mecanismos propostos para explicar a associação da obesidade com tumores mamários RE positivos.....	22
ESQUEMA 2: Relação entre obesidade, inflamação e as adipocinas SAA e adiponectina....	23
ESQUEMA 3: Representação hipotética de que concentrações elevadas de SAA e diminuídas de adiponectina, no câncer de mama, são decorrentes da inflamação que acompanha a obesidade. ....	27
ESQUEMA 4: Representação hipotética da associação entre obesidade, síndrome metabólica e câncer de mama. ....	28
Quadro 1. Especificações dos anticorpos. ....	34
Tabela 1. Características demográficas e antropométricas das pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa, nos diferentes grupos .....	40
Tabela 2. Comparação das concentrações séricas de SAA e adiponectina entre os diferentes grupos de pacientes com de câncer de mama na fase pós-menopausa.....	41
Tabela 3. Frequência das características clínico-patológicas do câncer de mama nos diferentes grupos de pacientes.....	42
Tabela 4. Concentrações de SAA e adiponectina em pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa, com diferentes características clínico-patológicas.....	44
Tabela 5. Comparação dos parâmetros bioquímicos das pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa entre os diferentes grupos.....	45
Tabela 6. Frequência de parâmetros bioquímicos alterados nos diferentes grupos de pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa .....	46
Figura 1. Associação da SAA com IMC, CA e glicose.....	47
Figura 2. Associação da adiponectina com glicose, triglicerídeos e HDL-Col.....	49
ESQUEMA 5: Representação hipotética da repressão da expressão do RE $\alpha$ via SAA. ....	52



<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 CÂNCER DE MAMA, OBESIDADE E INFLAMAÇÃO .....	21
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3- SUJEITOS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 SELEÇÃO DOS SUJEITOS .....	32
3.1.1 Critérios de inclusão .....	33
3.1.2 Critérios de exclusão .....	33
3.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO .....	33
3.3 EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO .....	34
3.3.1 Análise imunohistoquímica para definição do status dos receptores RE, RP e expressão do oncogene HER2 .....	34
3.4 COLETA DAS INFORMAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS .....	35
3.5 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE SAA .....	35
3.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ADIPONECTINA .....	36
3.7 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE COLESTEROL TOTAL E FRAÇÕES, TRIGLICERÍDEOS E GLICOSE .....	37
3.8 ANÁLISE DE DADOS .....	37
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E ANTROPOMÉTRICOS DAS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA NA PÓS-MENOPAUSA, CLASSIFICADAS EM GRUPOS DE ACORDO COM O IMC E A CA.....	40
4.2 COMPARAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE SAA E ADIPONECTINA ENTRE OS DOIS DIFERENTES GRUPOS DE PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA NA FASE PÓS-MENOPAUSA.....	41
4.3 COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO CÂNCER DE MAMA ENTRE OS DOIS GRUPOS DE PORTADORAS DA DOENÇA.....	41
4.4 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE SAA E DE ADIPONECTINA ENTRE AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA DOENÇA .....	43
4.5 ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE SAA COM PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS .....	46
4.6 ASSOCIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE ADIPONECTINA COM PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS .....	48
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6- CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
<b>8- ANEXOS .....</b>	<b>73</b>
8.1. ANEXO I – CHECK LIST .....	74
8.2. ANEXO II - TCLE.....	75
8.3. ANEXO III - QUESTIONÁRIO .....	77

# ***1- INTRODUÇÃO***

A obesidade tem aumentado consideravelmente nas últimas cinco décadas em todo o mundo (Hubáček, 2009). A Organização Mundial de Saúde estima que pessoas com sobrepeso ultrapassem a casa do bilhão e que cerca de 300 milhões sejam obesas (OMS, 2010). No Brasil, pesquisas publicadas pelo Ministério da Saúde (2009) mostram que a obesidade aumentou. A obesidade nos adultos atinge 13%, com maior incidência entre as mulheres e com frequência seis vezes mais elevada nas faixas entre 18-24 e 55-64 anos (Ministério da Saúde, 2009).

A obesidade impacta negativamente a saúde da mulher de muitas formas. Acarreta maior risco para diabetes (Gallagher *et al.*, 2008) e doença arterial coronariana (Weiss, 2009), prejudica a contracepção e a fertilidade (Lash e Armstrong, 2009), diminui a intenção, o início e a duração da amamentação (Hilson *et al.*, 2004) e leva ao aumento do risco de mortalidade neonatal e de malformações (Kristensen, 2005 e Stothard, 2009). Também tem sido associada à depressão (Ross, 1994), bem como ao alto risco para o desenvolvimento de vários cânceres, incluindo câncer endometrial (Kaaks, 2002), cervical (Maruthur *et al.*, 2009), ovariano (Leitzmann *et al.*, 2009) e de mama (Kuhl, 2005).

No câncer de mama, em particular, a obesidade tem se mostrado responsável pelo aumento de 30 a 50% na taxa de acometimento de mulheres na pós-menopausa (Tehard, 2006). Em nosso meio, estudo realizado no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher - CAISM/UNICAMP, envolvendo 250 mulheres com idade média de 52 anos, com câncer ginecológico e de mama, indicou que 21 % das mulheres eram obesas e 41% apresentavam sobrepeso (Zorlini e Gurgel, 2008). Entre as 132 portadoras de câncer de mama, 44% apresentavam sobrepeso e 7,5% eram obesas (dados não publicados). Além disso, outros estudos indicam que o aumento do índice de massa corpórea (IMC) está associado ao câncer de mama mais agressivo e a um período de sobrevida mais reduzido (Porter *et al.*, 2006).

O câncer de mama acomete predominantemente mulheres após os 30 anos de idade. A sua incidência se eleva a partir da faixa etária dos 40 anos (150/100.000), passa para a taxa de 250/100.000 mulheres aos 50 anos e chega a 350/100.000 aos 60 anos de idade (Kopans, 2000a), caracterizando assim sua maior frequência na fase pós-menopausa.

O principal sistema de estadiamento utilizado para a determinação do prognóstico, bem como da terapêutica adequada a ser ministrada, é o sistema TNM para a classificação dos tumores malignos, segundo as recomendações do American Joint Committee on Câncer (AJCC), revisadas por Singletary e colaboradores (2002). Este sistema considera a extensão do tumor na mama e em tecidos adjacentes como pele e parede torácica (T), a identificação da presença de metástases para linfonodos regionais como cadeias axilar, mamária interna, infra-clavicular e fossa supra-clavicular (N) e a identificação da presença de metástases à distância (M). Sete grupos de estádios podem ser identificados (estádios 0, I, IIa, IIb, IIIa, IIIb e IV) com as correspondentes probabilidades de sobrevida em 5 anos: 92%, 87%, 78%, 68%, 51%, 42% e 13%. Apesar dos avanços terapêuticos e diagnósticos, apenas cerca de 50% das pacientes têm câncer de mama diagnosticado em fase ainda restrita à glândula mamária (estádios 0, I e IIa) onde a sobrevida por período de cinco anos é superior a 60% (Kopans, 2000b).

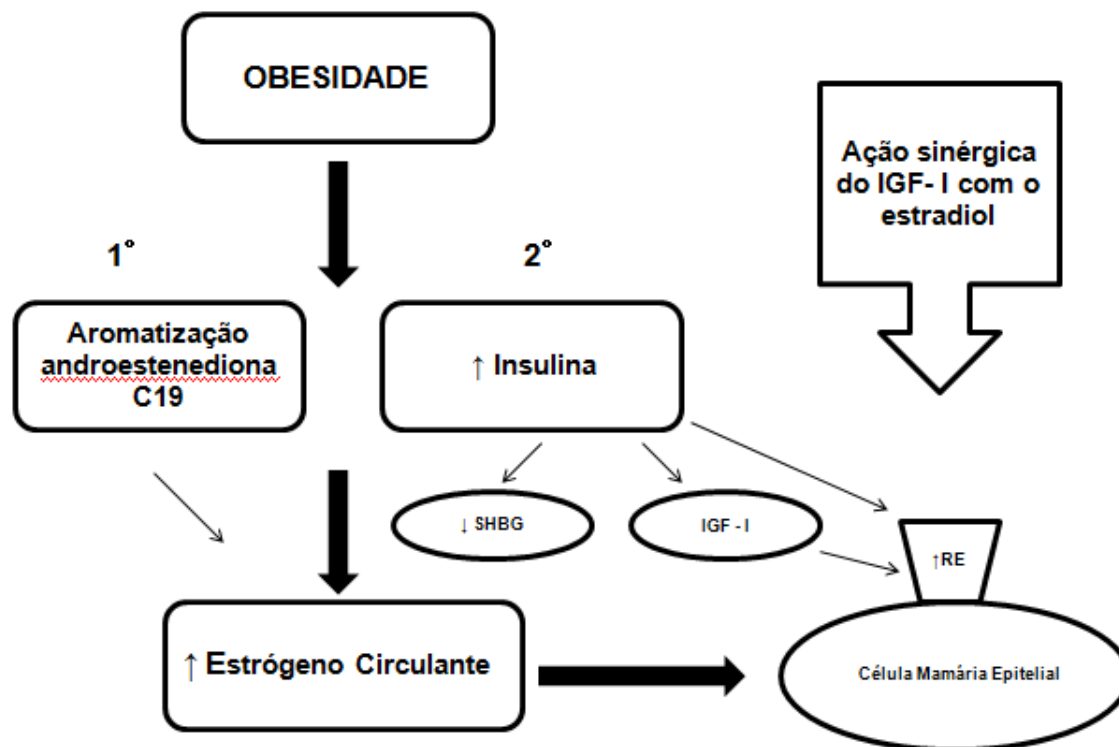
A evolução do câncer de mama primário varia conforme a paciente. Algumas vão apresentar longa sobrevida livre de doença, entretanto outras vão apresentar recidiva precoce seguida de óbito. Algumas dessas variações são explicadas pelos chamados fatores prognósticos, que conferem diferenças nas taxas de crescimento do tumor, no seu poder de invasão, no seu potencial metastático e em outros mecanismos que não são ainda completamente conhecidos. Fatores prognósticos são definidos como medida avaliável da sobrevida total e livre de doença no momento do diagnóstico ou cirurgia, sem a interferência do tratamento sistêmico adjuvante e são utilizados para prever a história natural do tumor. Os fatores prognósticos podem ser divididos em fatores anátomo-patológicos (tamanho, tipo histológico, grau do tumor, estado linfonodal axilar, angiogênese) e fatores biológicos (estado de receptores hormonais – estrógeno (RE) e progesterona (RP); índice de atividade proliferativa; ploidia ou índice de DNA; expressão de receptores para fatores de crescimento, tal como o receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 humano (HER2), entre outros produtos de oncogenes, estes últimos agrupados por Amadori e colaboradores (2002).

## 1.1 Câncer de Mama, Obesidade e Inflamação

Entre as hipóteses propostas para explicar a associação entre câncer de mama e obesidade na pós-menopausa, a primeira delas considera a concentração mais elevada de estrógeno circulante proveniente da aromatização de andrógenos no tecido adiposo de mulheres obesas em comparação ao de mulheres magras na pós-menopausa (Lorincz e Sukumar, 2006). O tecido adiposo é a maior fonte de biossíntese de estrógeno, visto que a aromatização do esteróide androstenediona C19, que é a principal fonte de estrona e estradiol circulante após a menopausa, se dá no tecido adiposo (Key *et al.*, 2003). O estrógeno é um importante fator biológico na promoção de câncer de mama e também tem sido associado à progressão para fenótipo invasivo e metastático em significativa parcela dos tumores mamários humanos (Vona-Davis e Rose, 2007). Todavia, a capacidade de responder à ação deste hormônio é dependente da presença e concentração de receptores de estrógeno (RE) nas células tumorais (Hemsell *et al.*, 1974; Lorincz e Sukumar, 2006). Desta forma, a associação do estrógeno com o desenvolvimento do câncer mamário é decorrente de sua ação na proliferação das células epiteliais mamárias, pela ativação direta das vias de sinalização intracelular mediadas pelos RE, acompanhada pela probabilidade aumentada de ocorrência de mutação durante a síntese de DNA (Yager, 2000).

Um segundo mecanismo considera o estado hiperinsulinêmico que geralmente acompanha a obesidade, e que é uma das anormalidades metabólicas diretamente relacionadas com o risco de câncer de mama (Krebs *et al.*, 2006 e Larson *et al.*, 2007). Ao lado de suas ações mitogênicas, a insulina e os *insulin-like growth factors* (IGF) podem também ativar a transcrição do RE em linhagens celulares de câncer de mama (Moscho e Mantozoros, 2002), como demonstrado pela ação sinérgica entre IGF-I e estradiol na ativação transcricional dos RE (Yee e Lee, 2000). Em adição, a hiperinsulinemia crônica inibe a síntese hepática da globulina ligante de hormônio sexual (SHBG). Esta globulina é uma glicoproteína plasmática que se liga com alta afinidade aos esteróides sexuais e controla a sua biodisponibilidade e acesso a células alvo. Deste modo, a inibição da síntese de SHBG contribui para o aumento da biodisponibilidade de andrógenos e estrógenos circulantes (Madigan e Trosi, 1998).

Estes mecanismos demonstram a associação da obesidade com tumores mamários RE positivos, mas não explicam a relação da obesidade com tumores RE-negativos (Godden *et al.*, 1992; Hou *et al.*, 2007).

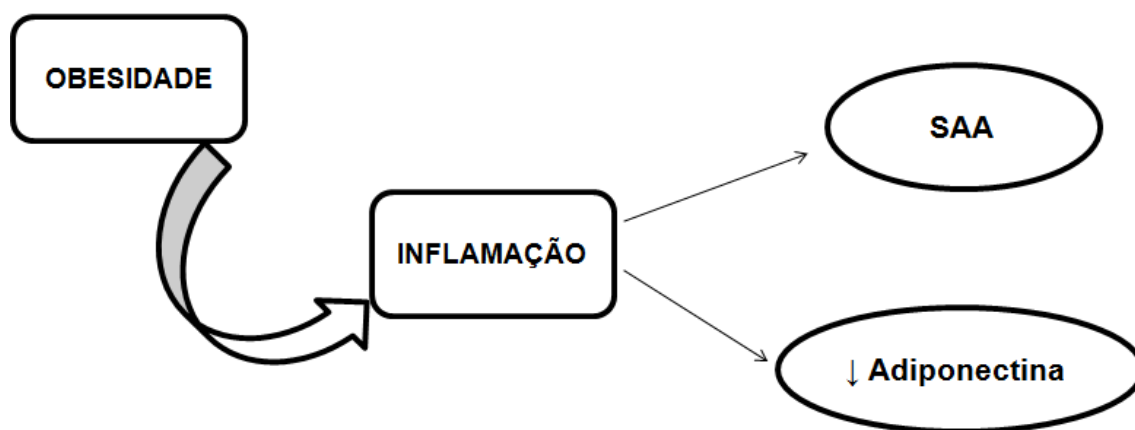


**ESQUEMA 1:** Mecanismos propostos para explicar a associação da obesidade com tumores mamários RE positivos.

Ao lado das hipóteses acima, outros autores, ao relacionarem a obesidade com câncer de mama, especialmente quando da instalação e progressão na pós-menopausa, referem a importância de outros fatores secretados pelo tecido adiposo, entre os quais as adipocinas ou adipocitocinas (Lorincz e Sukumar, 2006; Vona-Davis e Rose, 2007).

Nos últimos anos, o tecido adiposo deixou de ser considerado um mero depósito de gordura, sendo agora reconhecido como um órgão endócrino que participa do controle de uma grande diversidade de funções biológicas. A comunicação entre o tecido adiposo e outros sistemas biológicos é realizada através da expressão de um grande número de mediadores bioativos, que são chamados coletivamente de “adipocinas” (Frayn *et al.*,

2003). Além disso, na obesidade, o tecido adiposo é caracterizado por um baixo grau de inflamação crônica (Trayhum, 2005), com a produção de uma grande quantidade de moléculas bioativas (adipocitocinas), entre as quais o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e a proteína soro amilóide A (SAA), que possuem ação pró-inflamatória. Por outro lado, a adiponectina, que possui atividade antiinflamatória, tem sua síntese diminuída na obesidade (Yamauchi *et al.*, 2003).



**ESQUEMA 2:** Relação entre obesidade, inflamação e as adipocinas SAA e adiponectina

A transformação maligna pode ser estreitamente associada à inflamação crônica e as secreções de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda podem representar a principal causa para esta estreita conexão. A inflamação é comum no câncer de mama e tem sido associada com a instalação e progressão da doença (Lithgow e Covington, 2005). Sua associação com a promoção de carcinogênese tem sido demonstrada por processos complexos, como a polarização de macrófagos associados ao tumor (TAM), via ação de citocinas e subsequente produção de fatores de crescimento tumoral, ou pela promoção de angiogênese (De Nardo e Coussens, 2007; Ulrich *et al.*, 2006).

Ampliando ainda mais a complexidade do cenário, temos a obesidade como um dos componentes centrais da síndrome metabólica, que é caracterizada por um conjunto de



distúrbios metabólicos, que têm em comum o estado inflamatório crônico (Devaraj *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2005) e que têm sido associados individual, ou coletivamente, ao câncer de mama na pós-menopausa (Capasso *et al.*, 2011; Healy *et al.*, 2010) e, mais recentemente, aos tumores triplo negativos (Maiti *et al.*, 2010), assim denominados pela ausência de expressão dos receptores RE, RP e HER2 e que são considerados mais agressivos e de pior prognóstico, pela impossibilidade de resposta à terapia hormonal.

Nos últimos anos, as adipocinas SAA e adiponectina, que possuem funções antagônicas, têm recebido notável destaque na literatura por suas associações com aspectos metabólicos e inflamatórios ligados à obesidade (Matsubara *et al.*, 2002; Hoffstedt *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Poitou *et al.*, 2006; Lappalainen *et al.*, 2008).

Por outro lado, ambas têm sido relacionadas com o câncer de mama. Estudos relatam que concentrações aumentadas de SAA (O'Hanlon *et al.*, 2002; Pierce *et al.*, 2009) e, inversamente, concentrações diminuídas de adiponectina (Myoshi *et al.*, 2003; Jarde *et al.*, 2011) correlacionam-se com riscos aumentados para o desenvolvimento e o pior prognóstico do câncer mamário.

Assim como a proteína C reativa (PCR), a SAA é uma proteína de fase aguda não específica. As duas são secretadas primariamente no fígado, em resposta a citocinas como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ . A SAA é secretada também pelo adipócito e está envolvida no transporte de colesterol, na degradação da matriz extra-celular e no recrutamento de células inflamatórias para o sítio da inflamação (Schultz,1990; Ulhar,1999; Manley *et al.*, 2006, Poitou *et al.*, 2009). A partir da detecção de sua síntese pelo tecido adiposo (Sjöholm *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006) esta proteína vem sendo aventada como um sensível marcador biológico de obesidade, com potencial uso clínico na avaliação de ganho e redução de adiposidade (Poitou *et al.*, 2006; Lappalainen *et al.*, 2008).

Além disso, tem sido considerada uma promotora de aterosclerose e inflamação vascular (Liang *et al.*, 1996). Dentre as suas propriedades, a SAA é conhecida por complexar-se à lipoproteína de alta densidade (HDL), no plasma. E tem sido reportado que concentrações mais elevadas de SAA na composição da partícula de HDL (HDL-SAA) interfere com as funções anti-aterogênica, anti-oxidativa e anti-inflamatória da HDL

(Abbas *et al.*, 2004). Estes mesmos autores demonstraram que a ingestão de estrógeno por mulheres em fase pós-menopausa, acarretou aumento nos níveis plasmáticos de SAA, com consequente elevação de sua concentração na composição da partícula de HDL.

Em relação às doenças malignas, há trinta anos a SAA já era associada ao seu desenvolvimento, especialmente ao processo metastático (Rosenthal *et al.*, 1979) e, na década de 80, teve relatado o seu valor no monitoramento de câncer de próstata (Kaneti *et al.*, 1984). Muitos anos após, em um estudo prospectivo, a SAA e a PCR foram consideradas fatores prognósticos para o câncer de mama, pela detecção de concentrações mais elevadas de ambas em portadoras de tumores mais avançados. Desta forma, postulou-se que estas proteínas poderiam ser utilizadas tanto na avaliação de risco, quanto na indicação da progressão do câncer mamário (O'Hanlon *et al.*, 2002). Pierce e colaboradores (2009) também demonstraram que concentrações elevadas de SAA foram associadas à reduzida sobrevida total em pacientes com câncer de mama.

Pacientes com câncer gástrico, com concentrações de SAA acima do normal, tiveram um aumento do risco de morte de aproximadamente quatro vezes (Chan *et al.*, 2007) e, ainda, altas concentrações foram associadas com o estágios mais avançados dos tumores (Chen *et al.*, 2007). Ramankulov e colaboradores (2008) propuseram que a SAA seria um indicador de metástases à distância, mas não um marcador tumoral precoce em pacientes com câncer renal, e Gutfeld e seu grupo (2006) relataram a expressão diferencial de SAA em células displásicas e neoplásicas na mucosa do cólon. Também a expressão gênica da SAA foi significativamente maior em células de carcinoma uterino papilar seroso, quando comparado com tecido endometrial normal (Cocco *et al.*, 2009), confirmando mais uma vez que a SAA não é apenas uma proteína secretada pelo fígado, mas também é um produto de outras células normais e neoplásicas.

Com função antagonista à SAA, a adiponectina é uma adipocina envolvida em vários processos biológicos do corpo humano e foi descrita como o primeiro peptídeo do tecido adiposo a apresentar concentrações diminuídas na obesidade (Ouchi *et al.*, 1999). A adiponectina é uma proteína de 30 kD secretada pelo tecido adiposo (Rajala e Scherer, 2003). Sua estrutura consiste de um domínio amino-terminal não-globular, um domínio colágeno-símile e um domínio carboxi-terminal globular (Scherer *et al.*, 1995) e pode ser

secretada nas formas de trímero ( $3 \times 1$ ), hexâmero ( $3 \times 2$ ) e 18 monômeros ( $3 \times 6$ ), estes últimos constituindo a forma de alto peso molecular (HMW) (Rajala e Scherer, 2003; Pajvani *et al.*, 2003). Em humanos, a concentração presente na circulação sanguínea é relativamente alta, variando de 0,5 a 30  $\mu\text{g/mL}$  (Whitehead *et al.*, 2006). Uma vez sintetizada pelos adipócitos ela exerce seus efeitos biológicos, principalmente através de seus receptores, AdipoR1 e AdipoR2 (Yamauchi *et al.*, 2003).

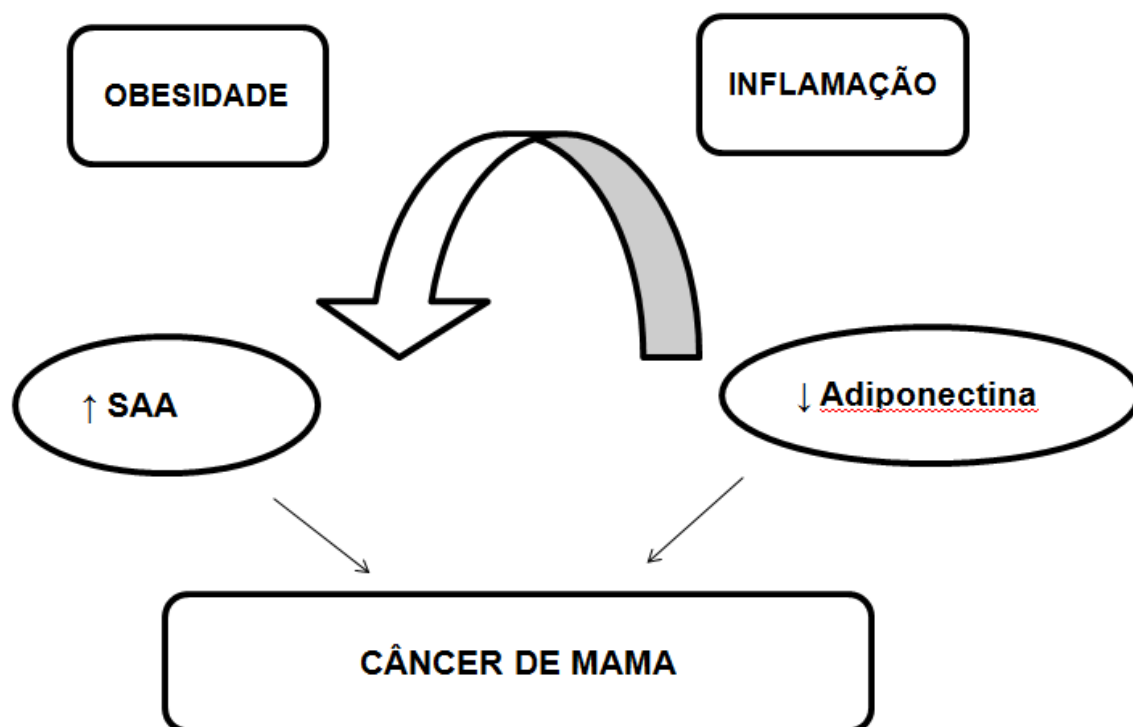
A expressão da adiponectina parece ser regulada por diferentes vias de sinalização, envolvendo diferentes fatores de transcrição. Estudos com adipócitos 3T3-L1 têm mostrado que o estresse oxidativo (Kamigaki *et al.*, 2006), a atividade do sistema nervoso simpático (Fasshauer *et al.*, 2001) e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 (Kim *et al.*, 2005), suprimem a sua expressão. As concentrações de adiponectina têm sido associadas com idade e sexo, encontrando-se diminuídas em homens, possivelmente como resultado do efeito de andrógenos (Nishizawa *et al.*, 2002) e também no tabagismo, enquanto que a dieta do mediterrâneo e a atividade física aumentam suas concentrações circulantes (Gable *et al.*, 2006 e Tsukinoki *et al.*, 2005). Além disso, a hipoadiponectinemia tem sido estreitamente associada à obesidade, síndrome metabólica, *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Weyer *et al.*, 2001), hipertensão essencial (Iwashima *et al.*, 2004) e dislipidemia (Kazumi *et al.*, 2004).

Em relação ao câncer de mama, resultados de ensaios *in vitro* têm, na grande maioria das vezes, demonstrado a ação anti-tumoral da adiponectina. Ensaios realizados com as linhagens celulares de câncer mamário humano, MDA-MB-231 e T47D, estimuladas com adiponectina, apresentaram indução de apoptose e significativa diminuição da síntese de DNA e da proliferação celular (Kang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Também atuou na inibição do crescimento de outras duas linhagens celulares, Hs578T e SK-BR-3, mas não sobre o crescimento das linhagens, MCF-7 e HCC-38 (Kang *et al.*, 2005). No entanto, outros pesquisadores demonstraram que o crescimento das células MCF-7 foi negativamente regulado pela adiponectina (Dieudonne *et al.*, 2006; Arditì *et al.*, 2007), incluindo a indução de apoptose (Dieudonne *et al.*, 2006). Em concordância com os resultados experimentais, baixas concentrações de adiponectina sérica têm sido associadas

com um pior prognóstico de mulheres com câncer de mama na pós-menopausa (Miyoshi *et al.*, 2003; Mantzoros *et al.*, 2004).

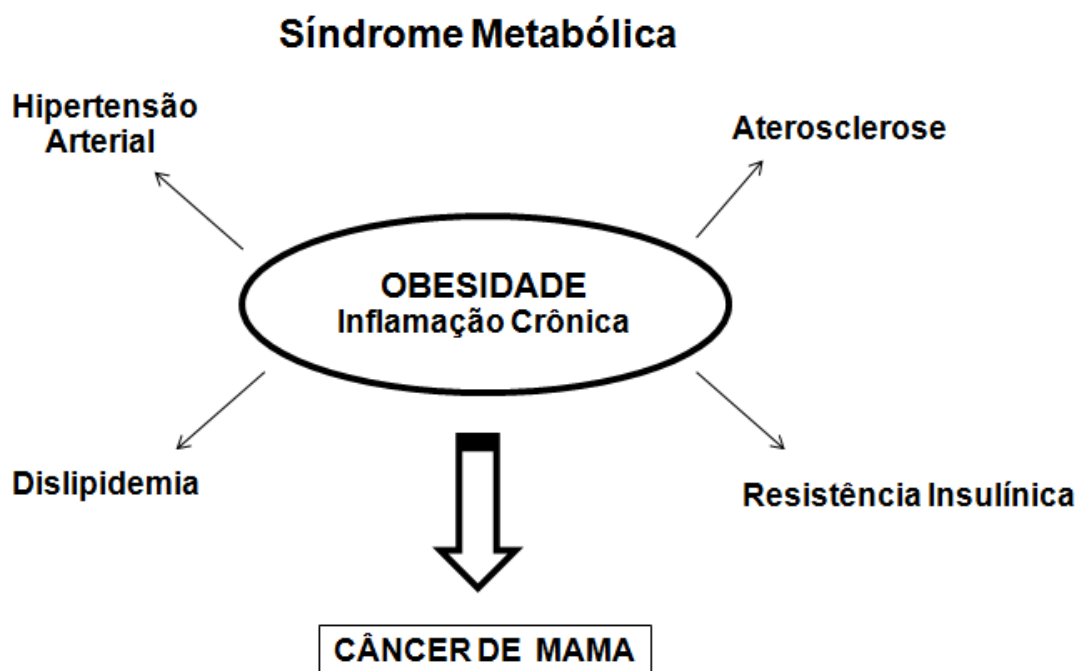
Embora exista associação patente entre altas concentrações de SAA, concentrações diminuídas de adiponectina e pior prognóstico de câncer de mama, essas proteínas nunca foram exploradas, nesta patologia, no contexto da obesidade.

Diante disso, o presente trabalho levanta as seguintes hipóteses: 1. As concentrações de SAA estariam mais elevadas e as de adiponectina mais reduzidas em portadoras de câncer de mama com sobrepeso/obesidade; 2. Neste grupo de pacientes, supondo-se a existência de resposta inflamatória mais intensa, haveria a presença de tumores mais agressivos e invasivos e com a resposta estrogênica negativa (RE<sup>-</sup>). 3. Ainda em decorrência da inflamação, as concentrações séricas de SAA e adiponectina apresentariam, respectivamente, associação direta e inversa com pior prognóstico da doença.



**ESQUEMA 3:** Representação hipotética de que concentrações elevadas de SAA e diminuídas de adiponectina, no câncer de mama, são decorrentes da inflamação que acompanha a obesidade.

Considerando ainda a estreita correlação da obesidade com vários distúrbios metabólicos, entre os quais dislipidemia e hiperglicemia, ambos também associados ao câncer de mama (Shah, 2008; Muti *et al.*, 2002; Rapp *et al.*, 2006), seria também plausível supor a existência de associação entre estes distúrbios e as adipocinas acima referidas. Esta suposição caracteriza-se como hipótese complementar neste estudo.



**ESQUEMA 4:** Representação hipotética da associação entre obesidade, síndrome metabólica e câncer de mama.

O estudo da relação entre obesidade, resposta inflamatória e câncer de mama na pós-menopausa é ainda incipiente. Assim, a constatação de que as concentrações de SAA e adiponectina são dependentes da obesidade e, por isto, estariam alteradas no câncer de mama, fundamentaria a intervenção terapêutica sobre a obesidade nesta patologia.

## ***2- OBJETIVOS***

## 2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar a associação entre obesidade, SAA e adiponectina em portadoras de câncer de mama na fase pós-menopausa e de suas relações com as características clínico-patológicas da doença.

## 2.2 Objetivos Específicos

- 1- Comparar as concentrações séricas de SAA entre os dois grupos de portadoras de câncer de mama na fase pós-menopausa: grupo sobrepeso/obesidade e grupo não-obesas.
- 2- Comparar as concentrações séricas de adiponectina entre os dois grupos de portadoras de câncer de mama na fase pós-menopausa: grupo sobrepeso/obesidade e grupo não-obesas.
- 3- Investigar a associação inversa entre as concentrações de SAA e adiponectina no grupo total de pacientes.
- 4- Comparar as características clínico-patológicas do câncer de mama entre os dois grupos de portadoras da doença: grupo sobrepeso/obesidade e grupo não-obesas.
- 5- Investigar a associação das concentrações séricas de SAA e de adiponectina com o estadiamento clínico-patológico da doença (ECP) e também com o *status* dos receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) e do fator de crescimento epidérmico tipo 2 humano (HER2).
- 6- Comparar as concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (colesterol total e frações (Col-T, HDL-Col e LDL-Col), triglicerídeos (TG) e glicose (Gli) entre os dois grupos de portadoras de câncer de mama na fase pós-menopausa: grupo sobrepeso/obesidade e grupo não-obesas.
- 7- Investigar a associação das concentrações séricas de SAA e de adiponectina com os parâmetros bioquímicos: Col-T, HDL-Col e LDL-Col, triglicerídeos (TG) e glicose (Gli).

### ***3- SUJEITOS E MÉTODOS***



### 3.1 Seleção dos sujeitos

No período de novembro/2009 a setembro/2011, setenta e três pacientes com diagnóstico de câncer de mama na fase pós-menopausa, com idade entre 45 e 80 anos (M=61) e que foram internadas na unidade de Oncologia Cirúrgica do CAISM-UNICAMP para o tratamento cirúrgico de carcinoma ductal invasivo primário, foram selecionadas para participar deste estudo.

A agenda das pacientes que seriam submetidas à cirurgia mamária era obtida na Divisão de Oncologia, com antecedência de 15 dias. No dia da internação, com o objetivo de constatar a possibilidade de participação da paciente na pesquisa, os dados eram verificados nos prontuários médicos e segundo os critérios de inclusão e exclusão (*Check List* – Anexo I) a paciente era convidada ou não a participar do estudo.

Após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – (TCLE – Anexo II) a paciente era entrevistada quanto aos seus dados demográficos, hábitos alimentares e de atividade física (Questionário – Anexo III), e também eram obtidos os seus dados antropométricos: peso, altura, circunferência abdominal (prega umbilical), circunferência do quadril (prega glútea). O índice de massa corpórea (IMC), foi calculado utilizando-se a fórmula  $\text{peso (kg)} / \text{estatura (m)}^2$ , que foi categorizado segundo a classificação da OMS (2009), IMC normal de 18,5-24,99  $\text{kg/m}^2$ , sobrepeso de 25,0-29,9  $\text{kg/m}^2$  e obesidade  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ . A aferição da circunferência abdominal (CA) foi realizada na altura da prega umbilical e o ponto de corte para CA normal ( $\leq 88 \text{ cm}$ ) foi estabelecido de acordo com Jansen *et al.*, 2004.

As pacientes foram então divididas em dois grupos: não obesas e com sobrepeso/obesidade, de acordo com as recomendações da OMS (2000), que preconiza o uso simultâneo de dois critérios: IMC e presença/ausência de adiposidade central. O grupo de não-obesas (n=19) foi composto por pacientes com  $\text{IMC} \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$  e  $\text{CA} \leq 88 \text{ cm}$ , e o grupo com sobrepeso/obesidade (n= 54) foi composto por pacientes com  $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$  (sobrepeso) ou  $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$  (obesidade) e  $\text{CA} > 88 \text{ cm}$ . A fase pós-menopausa foi determinada pela ausência de menstruação por doze meses consecutivos.

Tanto o protocolo de pesquisa quanto o TCLE foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), UNICAMP, sob o registro nº 782/2009.

### **3.1.1 Critérios de inclusão**

Para o grupo de pacientes com sobrepeso/obesidade: presença de câncer de mama, presença de gordura abdominal ( $CA > 88$  cm) e  $IMC \geq 25$   $kg/m^2$  (sobrepeso) ou  $\geq 30$   $kg/m^2$  (obesidade) e aceite em participar do estudo proposto.

Para o grupo de pacientes não-obesas: presença de câncer de mama, ausência de gordura abdominal ( $CA \leq 88$  cm),  $IMC \leq 24.9$   $kg/m^2$ , ausência de perda de peso acentuado e aceite em participar do estudo proposto.

### **3.1.2 Critérios de exclusão**

1) IMC abaixo do normal, 2) tratamento quimioterápico e/ou radioterápico prévio, 3) presença de outro tipo de câncer associado, 4) sinais clínicos e/ou relato de infecções ou inflamações agudas ou crônicas, 5) relato de doença auto-imune, 6) relato de doenças pulmonares crônicas, 7) recusa em participar do estudo proposto e 8) reposição hormonal.

## **3.2 Coleta de material biológico**

Amostras de sangue foram coletadas (15 ml) com a paciente em jejum de 12 horas no dia da cirurgia. Após 30 minutos à temperatura ambiente, para retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (Beckman-GPR, Indianápolis, IN, EUA) por 10 minutos, a  $25^{\circ}C$  e 2.500 r.p.m. O soro foi distribuído em alíquotas de 500  $\mu L$  e armazenado no freezer a  $-20^{\circ}C$  ou  $-80^{\circ}C$ .

### 3.3 Exame Anátomo-patológico

As características anátomo-patológicas dos tumores foram determinadas a partir de amostras do tecido tumoral provenientes de peças cirúrgicas obtidas por mastectomia ou quadrantectomia. Após análise macroscópica, os fragmentos tumorais foram fixados em formalina, incluídos em parafina e seccionados. Os cortes histológicos foram corados por hematoxilina e eosina, para determinação do tipo histológico do tumor, bem como de seus graus de diferenciação histológica e nuclear. Estes últimos são classificados de acordo com os critérios de Scarff-Bloom-Richardson, modificado (Bloom *et al.*, 1957; Scarff *et al.*, 1968; Frierson *et al.*, 1995). Este exame é rotineiramente realizado pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas (HC) / UNICAMP.

#### 3.3.1 Análise imunohistoquímica para definição do *status* dos receptores RE, RP e expressão do oncogene HER2

Os receptores hormonais RE, RP e a expressão do oncogene HER2 foram avaliados pelo método imunohistoquímico. Estas análises são realizadas rotineiramente no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/UNICAMP utilizando-se a técnica da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, de acordo com HSU, HAINE & FANGER, 1981.

O Quadro 1 relaciona os respectivos anticorpos monoclonais que foram utilizados para a análise imunohistoquímica:

#### Quadro 1. Especificações dos anticorpos.

Anticorpo	Clone	Fabricante
HER2	c-erbB-2 Oncoprotein	Dako
Receptor de estrógeno	1D5	Dako
Receptor de progesterona	PgR 636	Dako

### **3.4 Coleta das informações clínico-patológicas**

As informações clínico-patológicas das pacientes foram coletadas dos prontuários médicos, com o auxílio da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Salete da Costa Gurgel, aproximadamente 60 dias após a cirurgia mamária. Estas incluíram o estadiamento clínico-patológico (ECP) da doença, bem como os resultados do exame anátomo-patológico e o *status* dos receptores RE, RP e HER2. O ECP foi determinado de acordo com o sistema TNM: T- extensão do tumor primário, N- ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais, M- ausência ou presença de metástase à distância (Brasil, 2004).

### **3.5 Quantificação das concentrações séricas de SAA**

As concentrações de SAA foram determinadas nas amostras de soro, por meio do kit comercial SAA Látex N (SIEMENS, Marburg, Alemanha), de alta sensibilidade (0,82 mg/L). As reações de micro-aglutinação em látex foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante e detectadas por nefelometria (BN Prospec, SIEMENS, Munique, Alemanha).

O método é inteiramente automatizado; partículas de poliestireno revestidas com um anticorpo monoclonal específico para SAA humana, ao serem misturadas com as amostras de soro, agregam-se com estas proteínas formando micro-aglutinados. Esses agregados dispersam luz quando irradiados. A intensidade desta dispersão é dependente das concentrações das respectivas proteínas na amostra e a quantificação das concentrações séricas é automaticamente realizada a partir de uma curva padrão, determinada a cada ensaio. A curva padrão é realizada a partir de 7 diluições seriadas do padrão SY SAA N, calibrado pelo padrão internacional da proteína SAA sérica - lote nº 92/680. Além disso, um controle interno (SY SAA), com concentração conhecida, é aferido em cada corrida. Os ensaios foram realizados exclusivamente para esta pesquisa, na Seção de Imunologia da Divisão de Patologia Clínica (DPC) do HC/UNICAMP. O valor de referência (VR) adotado foi de 6,4 mg/L, segundo a bula do kit comercial utilizado.

### 3.6 Quantificação das concentrações séricas de adiponectina

As concentrações de adiponectina foram determinadas nas amostras de soro, por meio de reações imunoenzimáticas – enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tipo sanduíche, utilizando-se kits comerciais da marca Millipore EZHADP- (St.Charles, MO, USA); com faixa de detecção: 0,78 ng/mL a 100 ng/mL.

Duplicatas das sete diluições da curva padrão da adiponectina recombinante humana, dos controles de qualidade QC1: (2,2-6,9 ng/mL) e QC2: (17-35 ng/mL) e das amostras de soro (diluídas 1:500), foram adicionadas às microplacas revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-adiponectina humana (anticorpo de captura) e incubadas com o anticorpo anti-adiponectina humana biotinizado (anticorpo de detecção), por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Após 3 lavagens com tampão de lavagem, seguiu-se a incubação com o conjugado enzima-avidina (Streptavidin-Horseradish Peroxidase-HRP), por 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Seguiu-se novo ciclo de 5 lavagens e incubação com o substrato (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-TMB), por até 10 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. A reação foi interrompida com a adição da solução de parada (HCL 0,3M). A intensidade da cor produzida foi correspondente a uma determinada densidade óptica (D.O.), detectada por espectrofotometria em leitora de placas, utilizando-se os filtros 450/590nm. A D.O. foi proporcional à concentração da adiponectina presente na amostra, calculada a partir da curva padrão, obtida por equação polinomial do segundo grau. As concentrações finais das amostras foram obtidas após multiplicação pelo fator de diluição (500). O ensaio foi considerado válido quando os controles de qualidade estavam dentro da faixa esperada (QC1-2,2 a 6,9 mg/mL e QC2-17 a 35mg/mL), e a diferença entre as densidades ópticas das duplicatas da curva, dos controles de qualidade e das amostras foi  $\leq 10\%$ . Os ensaios foram realizados exclusivamente para esta pesquisa, no Laboratório de Imunorregulação do Departamento de Patologia Clínica da FCM/UNICAMP. O valor de referência adotado foi de 0,5 a 30  $\mu\text{g/mL}$  (Magkos *et al.*, 2007).

### **3.7 Quantificação das concentrações séricas de colesterol total e frações, triglicerídeos e glicose**

As concentrações séricas de colesterol total (Col-T) e frações (LDL-Col, HDL-Col), triglicerídeos (TG) e glicose (Gli), foram determinadas por métodos enzimático-colorimétricos, em sistema de automação (Boehringer Mannheim Hitachi 917-Roche-Basileia, Suíça) utilizando reagentes comerciais da Roche (Mannheim, Alemanha) e expressos em mg/dL. Estas análises são rotineiramente realizadas na Seção de Bioquímica da DPC do HC/UNICAMP. Para o perfil lipídico foram adotados os valores de referência que seguem as recomendações da IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose/Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia (Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2007) e para a glicose, a recomendação da Sociedade Americana de Diabetes (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003). Valores de referência adotados: Col-T < 200 mg/dL, LDL-col  $\leq$  160 mg/dL, HDL-col  $\geq$  50 mg/dL (para mulheres), TG  $\leq$  150 mg/dL, Gli < 100 mg/dL.

### **3.8 Análise de Dados**

Devido à ausência de distribuição normal, as variáveis numéricas foram transformadas em postos (*ranks*) (Conover & Iman, 1981) e suas comparações entre os grupos foram realizadas pelos testes não-paramétricos de Mann-Whitney (2 grupos) ou Kruskal-Wallis (3 grupos) (Conover, 1971). A comparação das variáveis categóricas entre os grupos foi realizada pelo teste Qui-quadrado e as análises de correlação entre as variáveis numéricas foram feitas pelo teste de Spearman.

Para comparar os valores de SAA e adiponectina entre as variáveis categóricas, foi utilizada a análise de covariância (ANCOVA), ajustada para IMC e CA. Para estudar os fatores relacionados com as concentrações de SAA e adiponectina foi utilizada a análise de regressão linear, modelos univariado e múltiplo, com critério *Stepwise* de seleção de variáveis (Montgomery & Peck, 1982; Tabachnick & Fidell, 2001). E, para estudar os fatores associados com a expressão de HER2 foi utilizada a análise de regressão logística

univariada e multivariada, também com critério *Stepwise* de seleção de variáveis (Hosmer & Lemeshow, 1989).

Todas as análises foram realizadas pelo programa *The SAS System for Windows*, versão 9.1.3, SAS Institute Inc, 2002-2003 (Cary, NC, USA) e o nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

## ***4- RESULTADOS***



## 4.1 Dados demográficos e antropométricos das pacientes com câncer de mama na pós-menopausa, classificadas em grupos de acordo com o IMC e a CA

A tabela 1 representa os dados demográficos e antropométricos das pacientes incluídas no estudo e alocadas nos diferentes grupos de acordo com os critérios de IMC e CA. Como esperado, todas as variáveis antropométricas apresentaram diferença significativa entre os dois grupos (IMC ( $p < 0,0001$ ), CA ( $p < 0,0001$ ) e RCQ ( $p = 0,0028$ ). Também foi significativa a diferença quanto ao tempo de menopausa ( $p = 0,015$ ), embora as idades não tenham sido diferentes nos dois grupos.

**Tabela 1.** Características demográficas e antropométricas das pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa, nos diferentes grupos

	Sobrepeso/Obesidade n= 54	Não-obesas n= 19	Valor de <i>p</i>
Idade (anos)			
Mediana (IQR)	61 (55-67)	56 (51-65)	$p = 0,08$
Tempo de menopausa (anos)			
Mediana (IQR)	14 (6-20)	7 (3-17)	$p = 0,015^*$
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )			
Mediana (IQR)	30,6 (28,0-33,3)	22,6 (21,0-22,8)	$p < 0,0001^*$
CA (cm)			
Mediana (IQR)	102 (94-109)	84 (80-85)	$p < 0,0001^*$
RCQ			
Mediana (IQR)	0,95 (0,91-0,98)	0,89 (0,84-0,95)	$p = 0,0028^*$

Para a constituição dos grupos as pacientes foram classificadas segundo o índice de massa corpórea (IMC) e a circunferência abdominal (CA): Sobrepeso/obesidade:  $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ ,  $\text{CA} > 88 \text{ cm}$ . Não-obesas:  $\text{IMC} \leq 24,9 \text{ kg}/\text{m}^2$ ,  $\text{CA} \leq 88 \text{ cm}$ . RCQ: relação cintura quadril. Dados expressos como Mediana e IQR (variação interquartil). Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney. \*O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4.2 Comparação das concentrações séricas de SAA e adiponectina entre os dois diferentes grupos de portadoras de câncer de mama na fase pós-menopausa

Na tabela 2 observa-se que as concentrações séricas de SAA encontram-se mais elevadas em pacientes com sobrepeso/obesidade do que em não-obesas. Os diferentes grupos mostraram os seguintes valores de medianas e variação interquartis (IQR): 4,94 mg/mL (2,71-7,18) no grupo sobrepeso/obesidade vs. 2,66 mg/mL (1,52-4,18) em não-obesas ( $p= 0,008$ ). Por outro lado, as concentrações séricas de adiponectina não foram diferentes entre os grupos, nem houve associação inversa entre as duas proteínas, quando analisadas pelo teste de Spearman (dados não mostrados).

**Tabela 2.** Comparação das concentrações séricas de SAA e adiponectina entre os diferentes grupos de pacientes com de câncer de mama na fase pós-menopausa

		Sobrepeso/Obesidade		Não-obesas	Valor de $p$
SAA (mg/L)	n= 53		n= 19		
Mediana (IQR)		4,9 (2,8-7,1)		2,7 (1,5-4,2)	$p= 0,008^*$
Adiponectina ( $\mu\text{g/mL}$ )	n= 40	11,2 (9,7-13,9)	n= 16	14,9 (10,0-16,8)	$p= 0,16$
Mediana (IQR)					

Para a constituição dos grupos as pacientes foram classificadas segundo o IMC e a circunferência abdominal (CA): Sobrepeso/obesidade:  $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ,  $\text{CA} > 88 \text{ cm}$ . Não-obesas:  $\text{IMC} \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$ ,  $\text{CA} \leq 88 \text{ cm}$ . Dados expressos como Mediana e IQR (variação interquartis). Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney. \*O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

## 4.3 Comparação das características clínico-patológicas do câncer de mama entre os dois grupos de portadoras da doença

Como se observa na tabela 3, não houve diferença significativa entre os grupos, em relação ao estadiamento clínico-patológico ou à expressão dos receptores RE ou RP. Entretanto, a frequência da expressão de HER2 foi maior no grupo de não-obesas do que no grupo sobrepeso/obesidade (59 vs. 30%,  $p= 0,034$ ).

Com o objetivo de melhor avaliar esse achado e investigar a relação da expressão de HER2 com todas as outras co-variáveis em estudo, foi realizada análise de regressão logística univariada para HER2+, com critério *Stepwise* de seleção de variáveis, seguida de regressão multivariada para as variáveis significativamente selecionadas na análise univariada. O resultado da regressão logística multivariada mostrou que somente o tempo de menopausa apresentou associação significativa com HER2+, com a razão de risco (*Odds Ratio* (OR)) para a expressão de HER2 de 0,93 e intervalo de confiança (CI) de 95%, (0,87-0,99),  $p= 0,035$ , demonstrando que, quanto menor o tempo de menopausa, maior o risco da expressão de HER2 ocorrer e que, cada ano de menopausa diminui o risco em 6,7%.

**Tabela 3.** Frequência das características clínico-patológicas do câncer de mama nos diferentes grupos de pacientes

	Sobrepeso/Obesidade n=54 (%)	Não-obesas n=19 (%)	Valor de $p$
ECP I <sup>#</sup>	35	35	$p= 0,91$
ECP II	46	41	$p= 0,91$
ECP III	19	24	$p= 0,91$
RE+	86	78	$p= 0,46$
RP+	55	67	$p= 0,39$
HER2+	30	59	$p= 0,03^*$

<sup>#</sup>ECP (estadiamento clínico-patológico) estabelecido de acordo com o sistema TNM (T= extensão do tumor; N= comprometimento de linfonodos; M= metástase à distância). Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2); Receptor de estrógeno (RE); Receptor de progesterona (RP). Para a constituição dos grupos as pacientes foram classificadas segundo o IMC e a circunferência abdominal (CA). Sobrepeso/obesidade: IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>, CA > 88 cm. Não-obesas: IMC  $\leq 24.9$  kg/m<sup>2</sup>, CA  $\leq 88$  cm. Dados expressos como %. A comparação das frequências foi realizada pelo teste Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ). \*O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0.05$ ).

#### **4.4 Avaliação das concentrações séricas de SAA e de adiponectina entre as variáveis clínico-patológicas da doença**

Para comparar as concentrações séricas de SAA e adiponectina entre as pacientes com diferentes características de tumores, foi realizada a análise de covariância (ANCOVA), com ajuste para IMC e CA. A tabela 4 mostra diferença significativa nas concentrações séricas de SAA entre pacientes apresentando tumores RE<sup>-</sup> e RE<sup>+</sup>, com mediana e (IQR) de 5,28 mg/mL (4,18-6,57) em pacientes com tumores RE<sup>-</sup> vs. 3,30 mg/mL (2,01-6,77) em pacientes com tumores RE<sup>+</sup> ( $P= 0,033$ ). As concentrações séricas de adiponectina, entretanto, não se mostraram diferentes entre as formas de apresentação das características clínico-patológicas da doença.

**Tabela 4.** Concentrações de SAA e adiponectina em pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa, com diferentes características clínico-patológicas

		SAA (mg/L)	Adiponectina (µg/mL)	
ECP I	n=24		n=19	
Mediana (IQR)		3,3 (2,6-6,0)		11,3 (10,0-14,1)
ECP II	n=30		n=22	
Mediana (IQR)		3,5 (2,0-6,8)		13,1 (8,8-15,3)
ECP III	n=14		n=14	
Mediana (IQR)		5,3 (1,7-19,1)	$p = 0,45$	12,5 (10,6-15,7) $p = 0,69$
RE+	n=55		n=45	
Mediana (IQR)		3,3 (2,0-6,8)		11,5 (9,5-14,5)
RE <sup>-</sup>	n=11		n=10	
Mediana (IQR)		5,3 (4,2-6,6)	$p = 0,03^*$	13,9 (11,2-15,7) $p = 0,08$
RP+	n=38		n=32	
Mediana (IQR)		3,0 (1,7- 6,6)		12,5 (10,1-15,1)
RP <sup>-</sup>	n=28		n=23	
Mediana (IQR)		4,3 (3,1-7,4)	$p = 0,07$	11,3 (9,5-15,7) $p = 0,82$
HER2+	n=23		n=20	
Mediana (IQR)		4,2 (2,5-6,0)		10,6 (8,4-15,8)
HER2 <sup>-</sup>	n=49		n=32	
Mediana (IQR)		3,3 (2,4-7,0)	$p = 0,38$	12,6 (10,4-14,9) $p = 0,10$

As pacientes foram agrupadas segundo as características clínico-patológicas da doença. Dados expressos como Mediana e IQR (variação interquartis). Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney (2 grupos) ou Kruskal-Wallis (3 grupos), complementados pela análise da covariância (ANCOVA), com  $p$  valor ajustado para IMC e CA.

Conforme se verifica na **Tabela 5**, dentre os parâmetros bioquímicos analisados, apenas as concentrações de glicose apresentaram-se significativamente mais elevadas no grupo de sobrepeso/obesidade do que no grupo de não-obesas ( $p = 0,016$ ). Em relação aos parâmetros lipídicos, embora não significante estatisticamente, as concentrações de triglicerídeos apresentaram uma tendência de maior elevação no grupo de sobrepeso/obesidade ( $p = 0,075$ ). Entretanto, quando se procedeu a análise da frequência de parâmetros bioquímicos alterados entre os grupos (**Tabela 6**), foi possível observar que o

grupo de não-obesas apresentou maior frequência de valores acima do normal de colesterol total 58% vs. 32% ( $p= 0,042$ ) e o grupo com sobrepeso/obesidade tendência de maior frequência de concentrações alteradas de glicose, 26% vs. 5% ( $p=0,09$ ).

**Tabela 5.** Comparação dos parâmetros bioquímicos das pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa entre os diferentes grupos

	Sobrepeso/Obesidade n= 54	Não-obesas n= 19	Valor de $p$
Col-T (mg/dL)			
Mediana (IQR)	191 (170-204)	207 (173-226)	$p= 0,20$
HDL-Col (mg/dL)			
Mediana (IQR)	43 (38-53)	51 (40-57)	$p= 0,25$
LDL-Col (mg/dL)			
Mediana (IQR)	116 (99-129)	127 (105-152)	$p= 0,09$
TG (mg/dL)			
Mediana (IQR)	122 (85-162)	93 (72-130)	$p= 0,075$
Gli (mg/dL)			
Mediana (IQR)	94 (87-103)	88 (83-91)	$p= 0,016^*$

Para a constituição dos grupos as pacientes foram classificadas segundo o IMC e a circunferência abdominal: Sobrepeso/obesidade:  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ,  $CA > 88 \text{ cm}$ . Não-obesas:  $IMC \leq 24.9 \text{ kg/m}^2$ ,  $CA \leq 88 \text{ cm}$ . Col-T: colesterol total; HDL-Col: lipoproteína de alta densidade; LDL-Col: lipoproteína de baixa densidade; TG: triglicerídeos; Gli: glicemia. Valores de referência dos parâmetros bioquímicos: Col-T:  $< 200 \text{ mg/dL}$ ; LDL-C:  $\leq 160 \text{ mg/dL}$ ; HDL-C:  $\geq 50 \text{ mg/dL}$ ; TG:  $\leq 150 \text{ mg/dL}$ ; Gli:  $< 100 \text{ mg/dL}$ . Dados expressos como Mediana e IQR (variação interquartis). Análises realizadas pelo teste de Mann-Whitney. \*O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 6.** Frequência de parâmetros bioquímicos alterados nos diferentes grupos de pacientes com câncer de mama na fase pós-menopausa

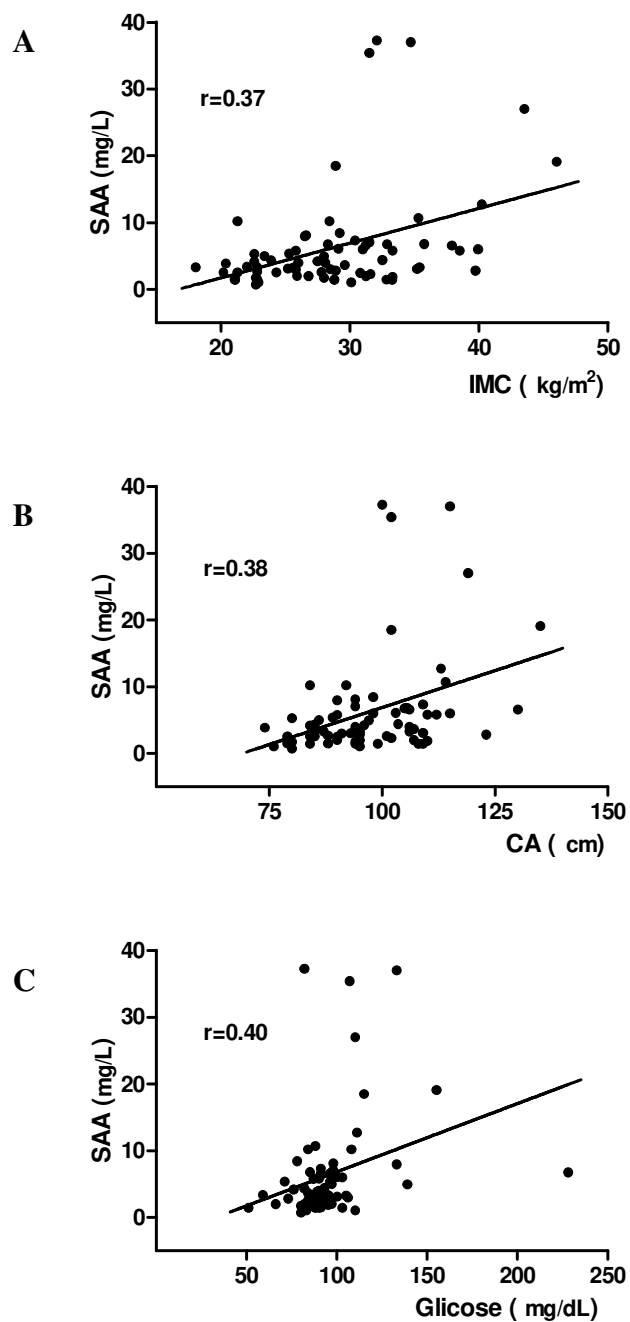
	Sobrepeso/Obesidade n=54 (%)	Não obesas n=19 (%)	Valor de <i>p</i>
COL-T $\geq$ 200 mg/dL	32	58	<i>p</i> = 0,04*
LDL-Col $\geq$ 160 mg/dL	4	11	<i>p</i> = 0,26
HDL-Col < 50 mg/dL	69	47	<i>p</i> = 0,10
TG > 150 mg/dL	32	16	<i>p</i> = 0,18
Gli $\geq$ 100 mg/dL	26	5	<i>p</i> = 0,09

Para a constituição dos grupos as pacientes foram classificadas segundo o IMC e a circunferência abdominal (CA): Sobrepeso/obesidade: IMC  $\geq$  25 kg/m<sup>2</sup>, CA > 88 cm. Não-obesas: IMC  $\leq$  24,9 kg/m<sup>2</sup>, CA  $\leq$  88 cm. Col-T: colesterol total; HDL-Col: lipoproteína de alta densidade; LDL-Col: lipoproteína de baixa densidade; TG: triglicerídeos; Gli: glicemia. Valores de referência dos parâmetros bioquímicos: Col-T:  $\square$  200 mg/dL; LDL-C:  $\leq$  160 mg/dL; HDL-C:  $\geq$  50 mg/dL; TG:  $\leq$  150 mg/dL; Gli:  $\square$  100 mg/dL. Dados expressos como %. A comparação das frequências foi realizada pelo teste Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ). \*O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5 Associação das concentrações séricas de SAA com parâmetros antropométricos e bioquímicos

Quando o grupo total de pacientes foi analisado quanto à associação das concentrações séricas de SAA com os diferentes parâmetros antropométricos e bioquímicos, verificou-se, pelo teste de Spearman, que as concentrações de SAA encontram-se positivamente associadas ao IMC ( $r= 0,37$ ,  $P= 0,001$ ), CA ( $r=0,38$ ,  $P = 0,0006$ ) e glicemia ( $r= 0,40$ ,  $P= 0,0003$ ), como demonstrado na **Figura 1**. Os resultados da análise de regressão linear multivariada para SAA, que foi realizada usando o critério *Stepwise* de seleção de variáveis, mostrou que IMC ( $P= 0,010$ ), CA ( $P= 0,010$ ) e glicemia ( $P < 0,014$ ), apresentaram relações significativas com a SAA, permitindo constatar que

pacientes com altas concentrações de SAA apresentam glicemia mais elevada e são obesas (maiores IMC e CA).



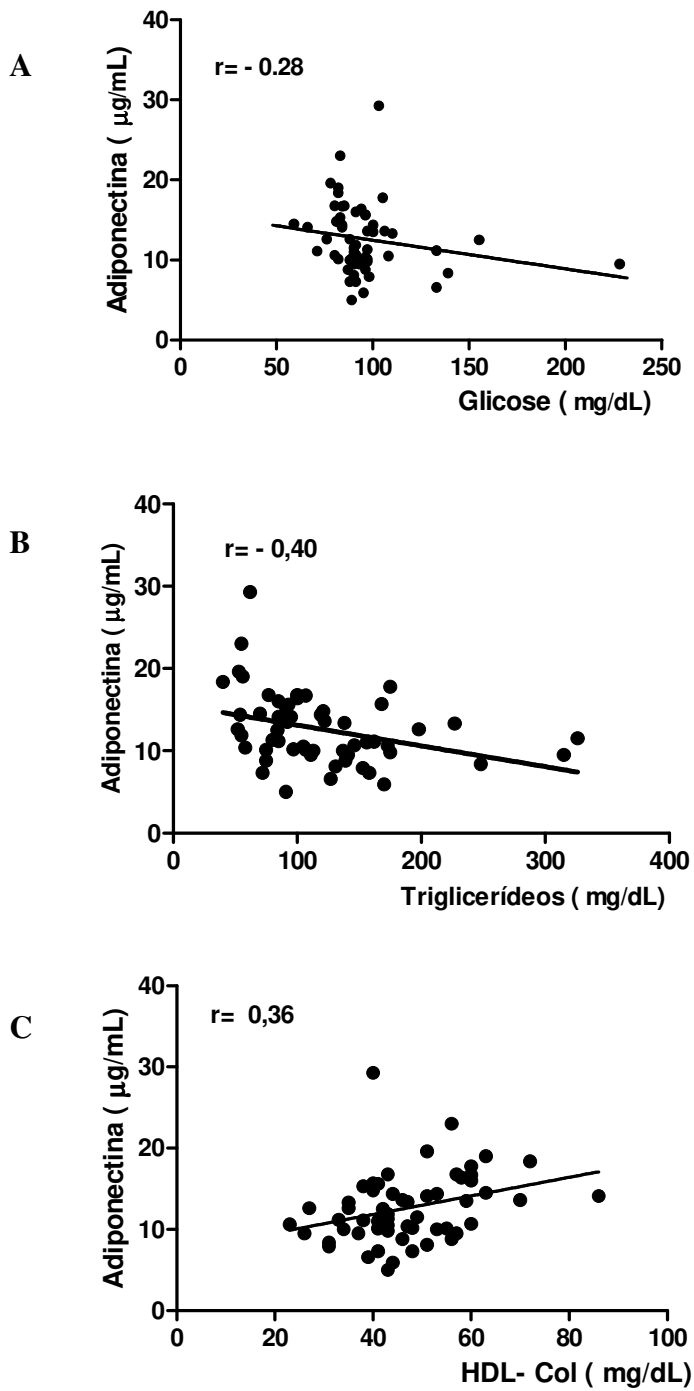
**Figura 1.** Associação da SAA com IMC, CA e glicose

(A) Correlação positiva com IMC,  $r=0.37$ ,  $p= 0,01$ . (B) Correlação positiva com CA,  $r=0.38$ ,  $p=0,0006$ . (C) Correlação positiva com glicose,  $r=0.40$ ,  $p= 0,003$ . Correlações realizadas pelo teste de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).



## 4.6 Associação das concentrações séricas de adiponectina com parâmetros antropométricos e bioquímicos

Pela análise de correlação de Spearman, seguida das análises de regressão linear univariada e multivariada, realizada para as concentrações séricas de adiponectina, verificou-se que estas não se correlacionaram com nenhuma das variáveis antropométricas. Todavia, pelo teste de Spearman, foi observado que as concentrações de adiponectina foram negativamente correlacionadas com a glicemia ( $r = -0,28$ ,  $p = 0,03$ ) e com os triglicerídeos ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,002$ ) e positivamente associadas às concentrações de HDL-Col ( $r = 0,36$ ,  $p = 0,005$ ), como mostra a **Figura 2**. Entretanto, a análise multivariada confirmou apenas a relação inversa entre adiponectina e TG ( $p = 0,006$ ).



**Figura 2.** Associação da adiponectina com glicose, triglicédeos e HDL-Col.

(A) Correlação negativa com glicose,  $r = -0.28$ ,  $p = 0,03$ . (B) Correlação negativa com triglicédeos,  $r = -0,40$ ,  $p = 0,002$ . (C) Correlação positiva com HDL-Col,  $r = 0,36$ ,  $p = 0,005$ . Correlações realizadas pelo teste de Spearman. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0.05$ ).

## ***5- DISCUSSÃO***

No presente estudo, mulheres com câncer de mama na fase pós-menopausa apresentaram concentrações de SAA positivamente associadas com o IMC e a CA, demonstrando que pacientes com concentrações mais elevadas de SAA são obesas.

Além da produção hepática da SAA, é amplamente aceito que ela é uma adipocitocina, também produzida pelos adipócitos e capaz de mediar diretamente a inflamação associada à obesidade (Zhao *et al.*, 2010). E, em conjunto com outros mediadores inflamatórios (citocinas/proteínas), leva os adipócitos à inflamação crônica, que é acompanhada pela infiltração de células do sistema imune, como os macrófagos (Hotamisligil, 2006).

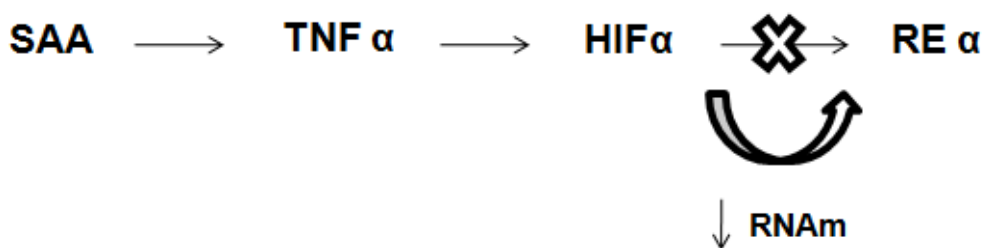
A inflamação crônica é uma contribuição chave para o desenvolvimento e promoção carcinogênica através de processos complexos, tais como a infiltração de macrófagos no tecido mamário pré-maligno (Schwertfeger *et al.*, 2006; De Nardo e Coussens, 2007). Desta forma, poderíamos inferir uma influência da obesidade, via SAA, no desenvolvimento de inflamação crônica, que levaria ao câncer de mama.

Alguns estudos têm demonstrado que a SAA está correlacionada com o risco de câncer de mama ou pior prognóstico desta doença (Blann *et al.*, 2002; Hanlon *et al.*, 2002 e Pierce *et al.*, 2009). Entretanto, nestes trabalhos, a SAA não foi avaliada sob a perspectiva da obesidade. Em nosso estudo, o fato das concentrações séricas de SAA estarem diferencialmente elevadas em pacientes com sobrepeso/obesidade, leva-nos à suposição de que a influência desta proteína, no desenvolvimento do câncer de mama, poderia ser devida à manutenção do estado inflamatório que acompanha a obesidade.

Para a constituição do grupo de pacientes não-obesas de nosso estudo, seguimos as recomendações da OMS, que preconiza o emprego do índice de massa corpórea (IMC), associado à avaliação da adiposidade central (WHO, 2000). Esta avaliação foi realizada pela medida da circunferência abdominal (CA), considerada superior em relação a outros métodos antropométricos, por guardar alta correlação com métodos de aferição mais precisos, como a ressonância magnética (Pouliot *et al.*, 1994). Além disso, recente metanálise demonstrou que a medida da circunferência abdominal mostrou melhor associação com vários distúrbios metabólicos, do que outras medidas antropométricas (van

Dijk *et al.*, 2012). Em nosso trabalho, este critério permitiu a comparação mais fidedigna das concentrações de adipocitocinas entre os grupos estudados, uma vez que o depósito intra-abdominal tem sido considerado mais metabolicamente ativo e relacionado à maior produção de citocinas do que outros depósitos (Blaudeau *et al.*, 2006; Alokail *et al.*, 2009). A importância deste critério também é destacada por Lee e colaboradores (2009), que mostraram que mulheres saudáveis, na transição da pré- para a pós-menopausa, apresentaram um aumento do depósito de gordura intra-abdominal e que este aumento foi positivamente correlacionado com alterações em várias adipocinas, incluindo SAA.

Neste trabalho não encontramos correlação entre as concentrações séricas de SAA e o estadiamento clínico-patológico da doença (ECP). Mas, em pacientes com tumores RE<sup>-</sup>, detectamos concentrações mais elevadas de SAA do que naquelas com tumores RE<sup>+</sup>. Pelo nosso conhecimento este resultado é inédito. Para explicar este resultado, poderíamos considerar a recente descoberta de Ryu e colaboradores (2011), que demonstraram que o *fator 1-alfa induzido por hipóxia* (HIF $\alpha$ ), reprime a expressão do receptor de estrógeno alfa (RE $\alpha$ ), nas linhagens celulares de câncer mamário humano, MCF-7 e T47D. Como o HIF $\alpha$  pode ser estimulado por muitos indutores, entre eles, o TNF $\alpha$  (Bilton e Booker, 2003) e considerando a capacidade da SAA em induzir a síntese de TNF $\alpha$ , seria razoável sugerir que, no microambiente tumoral mamário, enriquecido por fatores inflamatórios, poderia ocorrer a regulação positiva da produção de HIF $\alpha$  que, conseqüentemente, poderia atuar na repressão da expressão do RE.



**ESQUEMA 5:** Representação hipotética da repressão da expressão do RE $\alpha$  via SAA.

A demonstração da prevalência de HER2<sup>+</sup> entre pacientes não obesas, no presente trabalho, sugere que este marcador possivelmente é expresso por mecanismo independente da obesidade. Este resultado está de acordo com relato prévio de associação inversa entre IMC e a super-expressão de HER2, em mulheres com câncer de mama na pós-menopausa (Van Mieghem *et al.*, 2007). Corroborando estas demonstrações, a associação inversa entre tempo de menopausa e HER2<sup>+</sup>, encontrada no presente estudo, poderia sustentar a hipótese de um mecanismo independente da obesidade para a expressão de HER2<sup>+</sup>, uma vez que o *status* pré-menopausa tende a ser associado com o fenótipo não-obeso.

A associação entre obesidade e risco de câncer de mama tem induzido à especulação de que a hipoadiponectinemia, secundária à obesidade, poderia desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer de mama. Myoshi e colaboradores (2003) demonstraram que as concentrações séricas de adiponectina em portadoras de câncer mamário, tanto na fase pré-, como na pós-menopausa, associaram-se inversamente ao risco de câncer de mama e ao pior prognóstico. Em nosso trabalho, entretanto, a adiponectina não se correlacionou com o estadiamento clínico-patológico dos tumores, estando de acordo com os resultados de Chen (2006) e Hou (2007).

Outro fato importante no presente trabalho, diz respeito à ausência de diferença nas concentrações de adiponectina entre os grupos de pacientes com sobrepeso/obesidade e não-obesas. Este resultado pode levar à inferência de que a relação da adiponectina com o câncer de mama seria independente da obesidade, podendo ser atribuída a outros fatores relacionados à neoplasia. Hancke e seu grupo (2010) encontraram associação entre hipoadiponectinemia e risco de câncer de mama em pacientes obesas na pré-menopausa, mas não na pós-menopausa. Este fato também poderia justificar nossos resultados, uma vez que só investigamos pacientes na pós-menopausa. Uma outra possibilidade poderia ser o tamanho da amostra analisada até o momento, que não correspondeu à totalidade das pacientes em estudo.

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados em nosso trabalho (colesterol-T, LDL-Col, HDL-Col e triglicerídeos), apenas as concentrações de glicose apresentaram-se significativamente mais elevadas no grupo de sobrepeso/obesidade em relação ao grupo de não-obesas. E também a frequência de hiperglicemia foi maior no primeiro grupo. Outros

autores demonstram que elevadas concentrações de glicose foram diretamente correlacionadas com câncer de mama na pós-menopausa (Muti *et al.*, 2002; Rapp *et al.*, 2006) e também com sobrepeso e obesidade (Muti *et al.*, 2002).

Em relação aos parâmetros lipídicos, embora sem grande significado estatístico, as concentrações de TG apresentaram uma tendência de maior elevação no grupo de sobrepeso/obesidade. E, a análise da frequência de parâmetros lipídicos alterados, revelou que o grupo de não-obesas apresentou maior frequência de valores alterados de colesterol total, do que o grupo com sobrepeso/obesidade. O aumento de TG tem sido relatado em estudos que relacionam o câncer da mama com a síndrome metabólica (SM) (Capasso *et al.*, 2011). De acordo com o NCEP ATP III (*Third Report of the National Cholesterol Education Program*), a SM é caracterizada por obesidade central, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia. Como o TG elevado corresponde a um dos tipos de dislipidemia, na presença de obesidade e de outros fatores a ela associados, passa a constituir a SM (NCEP ATP III, 2002). Kim e seu grupo (2009) observaram concentrações alteradas de HDL-Col e TG em mulheres com câncer de mama e constataram que o estado dislipidêmico comum à SM, associava-se ao risco aumentado nesta neoplasia.

Quanto à maior frequência de Col-T elevado, observada no grupo de não-obesas, não há relato similar na literatura. Bahl e colaboradores (2005) consideraram seus resultados de concentrações alteradas de ColT e TG ainda incipientes, por mostrarem apenas uma tendência de associação ao risco de recorrência do câncer de mama. E apontaram a falta de consenso dos estudos voltados para a exploração da relação entre lípidos e câncer de mama, crítica compartilhada por Shah e colaboradores (2008).

Quanto à investigação da associação da SAA com os parâmetros bioquímicos, detectamos associação direta apenas com a glicose. A literatura não apresenta estudos específicos relacionando a SAA com parâmetros bioquímicos, no contexto do câncer de mama. Todavia, no contexto da obesidade, Poitou e colaboradores (2006) reportaram associação da SAA com adiposidade e inflamação, mas não com parâmetros lipídicos, glicose ou adiponectina.

Ao analisarmos a relação da adiponectina com os parâmetros bioquímicos, pelo teste de Spearman, observamos associações inversas com Glic e TG e direta com HDL-Col. Considerando a maior frequência de hiperglicemia em pacientes com sobrepeso/obesidade em nosso estudo, a correlação inversa entre as concentrações de adiponectina e glicose, poderia sugerir uma associação da adiponectina com a alteração metabólica deste grupo em particular. Esta suposição é levantada pelo fato da hiperglicemia ser um dos indicadores da resistência à insulina, que por sua vez relaciona-se com a supressão da produção da adiponectina no tecido adiposo (Hotta *et al.*, 2000; Matsubara, *et al.*, 2002). Entretanto, reconhecemos a fragilidade dessa especulação, pelo fato desta associação não ter se confirmado na análise de regressão linear multivariada.

Ainda em relação à adiponectina, as correlações direta com HDL-Col e inversa com TG, encontradas em nosso trabalho, estão de acordo com o estudo de Matsubara e seu grupo (2002), abordando a relação da adiponectina com a dislipidemia. Todavia, em nosso trabalho, a análise de regressão confirmou apenas a associação com TG.

Os mecanismos responsáveis pela ocorrência de dislipidemia no câncer de mama são ainda desconhecidos. Shah e colaboradores (2008) consideram que o próprio processo neoplásico poderia levar às alterações lipídicas. Entretanto, no contexto da obesidade, devemos ter sempre em mente a presença da inflamação crônica e de suas interações com os distúrbios metabólicos.

Pelo nosso conhecimento, esta é a primeira vez que se demonstra que as concentrações elevadas de SAA no câncer de mama são dependentes de obesidade (IMC e CA). Desta forma, poderíamos aventar um possível mecanismo pelo qual a obesidade, via SAA, e consequente inflamação, influenciaria no desenvolvimento do câncer de mama, em mulheres na pós-menopausa. Nesta linha de raciocínio, o tratamento da obesidade poderia controlar o estado inflamatório, possibilitando um melhor prognóstico para as portadoras da doença.

Neste estudo não foi possível correlacionar as concentrações séricas de SAA ou adiponectina com pior prognóstico. Uma das explicações reside nas limitações do nosso desenho de estudo, o estudo transversal, que não permite a verificação de causalidade.



Uma outra razão se deve à homogeneidade das características clínico-patológicas dos tumores da população estudada, possivelmente devido ao caráter primário dos tumores e/ou diagnóstico precoce. O acompanhamento desta população para avaliação da sobrevida total e sobrevida livre de doença poderá trazer contribuição futura com vistas a avaliar a importância biológica e/ou clínica da SAA e da adiponectina no câncer de mama.

É importante salientar que nosso trabalho não permite distinguir quanto da SAA é proveniente dos hepatócitos e quanto é proveniente do tecido adiposo, ou ainda, do tecido adiposo mamário. Trabalho futuro de investigação da expressão de SAA no tecido adiposo mamário poderá elucidar essa questão.

## ***6- CONCLUSÕES***

- 1- As concentrações séricas de SAA foram significativamente maiores em pacientes com sobrepeso/obesidade. Já as concentrações séricas de adiponectina não foram diferentes entre os grupos.
- 2- As concentrações séricas de SAA e de adiponectina não apresentaram correlação inversa entre si.
- 3- Pacientes com tumores RE<sup>-</sup> apresentaram concentrações mais elevadas de SAA. Entretanto não foi possível correlacionar SAA com ECP, RP ou HER2.
- 4- Não foi possível correlacionar adiponectina com ECP, RE, RP ou HER2.
- 5- A frequência da expressão de HER2 foi maior no grupo de não-obesas e essa expressão foi inversamente correlacionada com o tempo de menopausa.
- 6- Pacientes com sobrepeso/obesidade apresentaram maior frequência de hiperglicemia. E pacientes não-obesas, maior frequência de Col-T acima dos valores de normalidade.
- 7- As concentrações de SAA mostraram associação direta com as concentrações de Gli.
- 8- As concentrações de adiponectina mostraram associação inversa com as concentrações de Gli e TG e direta com as concentrações de HDL-col.

## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Abbas A, Fadel PJ, Wang Z, Arbique D, Jialal I, Vongpatanasin W. Contrasting effects of oral versus transdermal estrogen on serum amyloid A (SAA) and high-density lipoprotein-SAA in postmenopausal women. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 164-167.

Alokail MS, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Hussain T. Combined effects of obesity and type 2 diabetes contribute to increased breast cancer risk in premenopausal women. *Cardiovascular Diabetology* 2009, 8:33.

Amadori D, Casadei L, Giunchi, D. & Maltoni, R. Uso clínico dos fatores prognósticos e preditivos de resposta ao tratamento. In: VERONESI, U. et al. *Mastologia Oncológica*. 1<sup>a</sup> ed. MDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2002; p. 429-34.

Arditi JD, Venihaki M, Karalis KP, Chrousos GP Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm Metab Res.* 2007; 39: 9–13.

Bahl M, Ennis M, Tannock IF, Hux JE, Pritchard KI, Koo J et al. Serum lipids and outcome of early-stage breast cancer: results of a prospective cohort Study. *Breast Cancer Research and Treatment.* 2005; 94:135–144.

Bilton RL, Booker GW. The subtle side to hypoxia inducible factor (HIF $\alpha$ ) regulation. 2003; *Eur J Biochem* 270 (5): 791-8.

Blaudeau TE, Hunter GR and Siriku B. Intra-abdominal adipose tissue deposition and parity. *International Journal of Obesity.* 2006; 30, 1119–1124.

Bloom H. J. and Richardson W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. From the Meyerstein Institute of Radiotherapy and the Bland-Sutton Institute of Pathology of the Middlesex Hospital, London, Received for publication July 29, 1957.0

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.

Capasso I, Esposito E, Pentimalli F, Crispo A, Montella M, Grimaldi M et al. Metabolic syndrome affects breast cancer risk in postmenopausal women: National Cancer Institute of Naples experience. *Cancer Biol Ther.* 2011; 10:1240–1243.

Chan, D. C., Chen, C. J., Chu, H. C., Chang, W. K., Yu, J. C., Chen, Y. J., Wen, L. L., Huang, S. C., Ku, C. H., Liu, Y. C. and Chen, J. H. Evaluation of serum amyloid A as a biomarker for gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2007; 14, 84–93.

Chen, S. H., Liao, H. K., Chang, C. Y., Juo, C. G., Chen, J. H., Chan, S. I. and Chen, Y. J. Targeted protein quantitation and profiling using PVDF affinity probe and MALDI-TOF MS. *Proteomics.* 2007; 7, 3038–3050.

Cocco S, Bellone K, El-Sahwi M, Cargnelutti F, Casagrande N, Buza FA *et al.* Serum amyloid A (SAA): a novel biomarker for uterine serous papillary cancer. *British Journal of Cancer.* 2009; 101: 335 – 341.

Conover, W. J. (1971), *Practical Nonparametric Statistics*. New York: John Wiley & Sons.

Conover, W. J. & Iman, R. L. (1981), Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician*, 35, pp 124-129.

DeNardo DG, and Coussens LM. Inflammation and breast cancer: Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 2007, 9:212.

Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 2007; 88: 2-18.

Devaraj S, Rosenson RS, Jialal I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004; 33: 431-53.

Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345: 271–279.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett.* 2001; 507: 142–146.

Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 875–888.

Frierson HF., Wolber RA., Berean KW., Franquemont DW., Gaffey MJ., Boyd JC, Wilbur DC. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol.*1995; 103: 195-198.

Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2006; 188:231–244.

Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The metabolic syndrome—from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008; 37:559 –79, vii.

Godden J, Leak R & Kerr DJ. The response of breast cancer cells to steroid and peptide growth factors. *Anticancer Research.* 1992; 12:1683-1688.

Gutfeld O, Prus D, Ackerman Z, Dishon S, Reinhold P. Linke, Mark Levin, and Simcha Urieli-Shoval Expression of Serum Amyloid A, in Normal, Dysplastic, and Neoplastic Human Colonic Mucosa: Implication for a Role in Colonic Tumorigenesis *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2006; 54 (1): 63–73.

Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss J M. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (2010) 119:367–377.

Healy LA, Ryan AM, Carroll P, Ennis D, Crowley V, Boyle T, et al. Metabolic syndrome, central obesity and insulin resistance are associated with adverse pathological features in postmenopausal breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).*2010.

Hemsell DL, Grodin JM, Brenner PF, Silteri PK, MacDonaldD, PC. Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of extent of conversion of plasma androstedione to estrone with age. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1974; 38: 476-479.

Hilson JA, Rasmussen KM, Kjolhede CL. High prepregnant body mass index is associated with poor lactation outcomes among white, rural women independent of psychosocial and demographic correlates. *J Hum Lact.* 2004; 20:18 –29.

Hoffstedt J, Arvidsson E, Sjölin E, Wåhlén K, Arner P. Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(3):1391-6.

Hosmer, D.W. & Lemeshow, S. L. (1989), *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444:860–7.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Yoshihisa Okamoto et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1595-1599.

Hou W, Xu Y, Yu T, Zhang L, Zhang W, Fu C, et al. Adipocytokines and breast cancer risk. *Clin Med J.* 2007; 120(18):1592-1596.

Hsus-M, Haine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J.Histochem. Cytochem.* 1981; 29: 577-585.

Hubáček J. A. Eat Less and Exercise More – Is It Really Enough to Knock Down the Obesity Pandemia? *Physiol.* 2009; Res. 58; (Suppl. 1): S1-S6.

International Physical Activity Questionnaire-IPAQ [on line] [www.ipaq.ki.se](http://www.ipaq.ki.se) (acesso em 19 de junho de 2009).



Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Ouchi N, Ohishi M, Sugimoto K, et al. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension*. 2004; 43: 1318–1323.

Jansen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr*, 79:379-84, 2004

Jardé T, Caldefie-Chezet F, Goncalves-Mendes N, Mishellany F, Buechler C, Penault-Llorca F et al. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocrine-Related Cancer*; 2009; 16 1197–1210.

Kaaks R, Lukanova A, Kurzer MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1531– 43.

Kadowak T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*.2005 26:439-451.

Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, Ohira H, Ikeda D, Itoh N, Ishimaru S, Ohtsuka Y, Nishimura M. Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339: 624–632.

Kaneti J, Winikoff Y, Zimlichman S, Shainkin-Kestenbaum R. Importance of Serum Amyloid A (SAA) level in monitoring disease activity and response to therapy in patients with prostate cancer. *Urol. Res*.1984; 12:239-41.

Kang JH, Lee YY, Yu BY, Yang BS, Cho KH, Yoon DK et al. Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Arch Pharm Res*.2005; 28: 1263–1269.

Kazumi T, Kawaguchi A, Hirano T, Yoshino G. Serum adiponectin is associated with high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein particle size in young healthy men. *Metabolism*.2004; 53: 589–593.

Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam, A, Dorgan, JF, Long, C, et al. Body mass index, serum sex hormones-binding globulin and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*.2003; 95:1218-26.

Kim KY, Kim JK, Jeon JH, Yoon SR, Choi I, Yang Y. c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327: 460–467.

Kim Y, Park SK, Han W, Kim DH, Hong YH, Hee Ha E,. Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol and Breast Cancer Risk by Menopausal Status, Body Mass Index, and Hormonal Receptor in Korea. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*2009;18:508-515.

Kopans, D.B. - Epidemiologia, Etiologia, Fatores de risco, Sobrevida e prevenção do câncer de mama. In: *Imagem da mama*. 2ª Edição. MEDSI Editora Médica Científica Ltda, Rio de Janeiro, p 29-54, 2000 (a).

Kopans, D.B. - Estadiamento do Câncer de Mama. In: *Imagem da mama*. 2ª Edição. MEDSI Editora Médica Científica Ltda, Rio de Janeiro, p 107-16, 2000 (b).

Krebs EE, Taylor BC, Cauley JA, Stone KL, Bowman PJ, Ensrud KE:Measures of adiposity and risk of breast cancer in older postmenopausal women. *J Am Geriatr Soc.* 2006; 54:63-69.

Kristensen J, Vestergaard M, Wisborg K, Kesmodel U, Secher NJ. Pre-pregnancy weight and the risk of stillbirth and neonatal death. *BJOG.*2005; 112:403–8.

Kuhl H. Breast cancer risk in the WHI study: the problem of obesity. *Maturitas.* 2005; 51: 83–97.

Lappalainen T, Kolehmainen M, Schwab U, Pulkkinen L, Laaksonen DE, Rauramaa R, Uusitupa M, Gylling H. Serum concentrations and expressions of serum amyloid A and leptin in adipose tissue are interrelated: the Genobin Study. *Eur J Endocrinol.* 2008 Mar;158(3):333-41.

Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007; 121: 856-862.

Lash MM, Armstrong A. Impact of obesity on women's health. *Fertil Steril* 2009; 91: 1712– 6.

Lee CG, Carr MC, Murdoch SJ, Mitchell E, Woods NF, Wener MH, et al. Adipokines, Inflammation, and Visceral Adiposity across the Menopausal Transition: A Prospective Study. *Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(4):1104–1110.

Leitzmann MF, Koebnick C, Danforth KN, et al. Body mass index and risk of ovarian cancer. *Cancer* 2009;115: 812–22.

Liang JS, Schreiber BM, Salmons M, Phillip G, Gonnerman WA, de Beer FC, et al. Amino terminal region of acute phase, but not constitutive, serum amyloid A (apo SAA) specifically binds and transports cholesterol into aortic smooth muscle and HepG2 cells. *J Lipid. Res.*1996; 37: 2109-2116.

Lithgow D, Covington C. Chronic inflammation and breast pathology: a theoretical model. *Biological research for nursing.* 2005; 7: 118-129.

Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, Human Kinetics Book, 1998.

Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer.*2006; 13:279-292.

Madigan MP, Troisi R, Potischman N. Serum hormone levels in relation to reproductive and lifestyle factors in postmenopausal women (United States).*Cancer Causes Control.*1998; 9:199-207.

Magkos F, and Sidossis LS. Recent advances in the measurement of adiponectin isoform distribution. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2007; 10:571–575.

Maiti B, Kundranda MN, Spiro TP, Daw HA. The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;121:479–483.

Malle E, de Beer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest.* 1996; 26: 427–35.

Manley PN, Ancsin JB, Kisilevsky R. Rapid recycling of cholesterol: the joint biologic role of C- reactive protein and serum amyloid A. *Med Hypotheses.*2006; (4):784-792.

Mantzoros C, Petridous E, Dessyptis N, Chavelas C, Dalamaga M, Alexe DM, et al. Adiponectin and breast cancer risk. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89:1102-1107.

Maruthur NM, Bolen SD, Brancati FL, Clark JM. The association of obesity and cervical cancer screening: a systematic review and meta-analysis. *Obesity*. 2009;17: 375– 81.

Matsubara, M, Maruoka S, Katayose S. Decreased Plasma Adiponectin Concentrations in Women with Dyslipidemia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.2002; 87 (6): 2764–2769.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas para incidência e mortalidade por câncer 2009 [on line]. Rio de Janeiro; 2009. [http://www.inca.gov.br/inca/releases/press\\_estimativas2009.html](http://www.inca.gov.br/inca/releases/press_estimativas2009.html) (acesso em 24 de maio de 2009).

Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, Taguchi T, Tamaki Y, Matsuzawa Y et al. Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 2003; 9: 5699-5704.

Mochos, SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology*. 2002; 63: 317-332.

Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu. Rev. Med*. 2005; 56: 45-62.

Montgomery, D.C. & Peck, E.A. (1982), *Introduction to Linear Regression Analysis*. New York: John Wiley & Sons.

Muti P, Quattrin T, Grant BJ. Fasting glucose is a risk factor for breast cancer: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11:1361-1368.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte derived protein. *Diabetes* 2002; 51: 2734–2741.

O'Hanlon, DM, Lynch, J, Cormican, M, Given, HF. The acute phase response in breast carcinoma. *Anticancer Res.* 2002; 22 (2B): 1289-93.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Yet al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473–2476.

Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem.*2004; 279:12152–12162.

Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhouser ML, Wener, K. Elevated Biomarkers of Inflammation Are Associated With Reduced Survival Among Breast Cancer Patients. *J Clin Oncol.* 2009; 27:3437-3444.

Poitou C, Coussieu C, Rouault C, Coupaye M, Canello R, Bedel JF et al. Serum Amyloid A: A Marker of Adiposityinduced Low-grade Inflammation but Not of Metabolic Status. *Obesity.* 2006; 14: 309–318.

Poitou C, Divoux A, Faty A, Tordjman J, Hugol D, Aissat A et al. Role of Serum Amyloid A in Adipocyte-Macrophage. Cross Talk and Adipocyte Cholesterol Efflux. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94 (5): 810-1817.

Porter, GA, Inglis, KM, Wood, LA, Veugelers PJ. Effects of obesity on presentation of breast cancer. *Ann Sug Oncol.* 2006; 13: 327-332.

Pouliot MC, Després JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, Nadeau A, Lupien PJ. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol.* 1994; 73(7):460-8.

Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The Adipocyte - At the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis *Endocrinology.* 2003; 144 (9): 3765–3773.

Ramankulov A, Lein M., Johannsen M., Schrade M, Mille K, Loening S et al. A Serum amyloid A as indicator of distant metastases but not as early tumor marker in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Letters*. 2008; 269: 85–92.

Rapp K, Schroeder J, Klenk J. Fasting blood glucose and cancer risk in a cohort of more than 140,000 adults in Austria. *Diabetologia*. 2006, 49:945-952.

Rose DP, Haffner SM, Baillargeon M. Adiposity, the Metabolic Syndrome, and Breast Cancer in African-American and White American Women. *Endocrine Reviews* 28(7):763–777.

Rosenthal CJ, Sullivan LM. Serum amyloid A to monitor cancer dissemination. *Ann Intern Med*. 1979; 91: 383-90.

Ross CE. Overweight and depression. *J Health Soc Behav*. 1994; 35: 63–79.

Ryu K, Park C, Lee Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogen receptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Epub. 2011; 407 (4): 831-6.

Scarff RW, Torloni H. Histological typing of breast tumors. *International histological classification of tumors*. 1968; N° 2, WHO, Geneva.

Shah FD, Shukla SN, Shah PM, Hiten RH, Patel MS, Patel PS, et al. Properties of four acute phase proteins: C-reactive, serum amyloid A protein, alpha 1-caid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rbeum*. 1990; 20(3):129-147.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Harvey F, Lodish A. Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1995; Vol. 270, N°. 45, Issue of November 10, pp. 26746–26749.

Schultz DR, Arnold PI. Properties of four acute phase proteins: C-reactive, serum amyloid A protein, alpha 1-caid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum*. 1990; 20 (3): 129-147.

Schwertfeger KL, Xian W, Kaplan AM, Burnett SH, Cohen DA, Rosen JM. A critical role for the inflammatory response in a mouse model of preneoplastic progression. *Cancer Res.* 2006 Jun 1; 66 (11): 5676-85.

Singletary, S.E.; Allred, C.; Ashley, P. et al. – Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2002. 20 (17): 3576-7.

Sjöholm K, Palming J, Olofsson LE, Gummesson A, Svensson PA, Lystig TC et al. A microarray search for genes predominantly expressed in human omental adipocytes: adipose tissue as a major production site of serum amyloid A. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2005; 90: 2233–2239.

Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and metaanalysis. *JAMA* 2009; 301: 636 –50.

Tabachnick, B.G. & Fidell, L.S. (2001), *Using Multivariate Statistics*. Boston: Allyn and Bacon, 4<sup>th</sup> ed, p. 966.

Tehard B, Clavel-Chapelon F. Several anthropometric measurements and breast cancer risk: results of the E3N cohort study. *Int J Obes.* 2006; 30 (1): 156-163.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2003; 26: 3160-3167.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106(25):3143-421.

Tilg, H, Moschen, AR. Adipocitokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (10): 772-83.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004; 92: 347-55.

Tsukinoki R, Morimoto K, Nakayama K. Association between lifestyle factors and plasma adiponectin levels in Japanese men. *Lipids Health Dis* 2005; 4: 27.

Ulhar CM, Whitehead A. Serum amyloid A, the major vertebrate acute phase reactant. *Eur J Biochem.* 1999; 265: 501-523.

Ulrich CM, Bigler J, Potter JD: Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: Promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6:130-140.

Van Dijk SB, Takken T, Prinsen EC, Wittink H. Different anthropometric adiposity measures and their association with cardiovascular disease risk factors: a meta-analysis. *Neth Heart J.* 2012; 11:0237-7.

Van Mieghem T, Leunen K, Pochet N, De Moor B, De Smet F, Amant F et al. Body mass index and HER-2 overexpression in breast cancer patients over 50 years of age. *Breast Cancer Res Treat (2007)* 106:127–133.

Vlasova MA, Moshkovskii SA. Molecular interactions of acute phase serum amyloid A: possible involvement in carcinogenesis. *Biochemistry Mosc.* 2006; 71(10):1051-9.

Vona–Davis, L and Rose, PR. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine – Related Cancer*, 2007; 14: 189-206.

Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3 beta/beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res.* 2006 66: 11462-11470.

Weiss AM. Cardiovascular disease in women. *Prim Care.* 2009; 36:73–102.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1930–1935.

Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, et al. Adiponectin: a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2006; 8:264–280.

World Health Organization. Global Database on Body Mass Index. (2009) [on line]. <http://apps.who.int/bmi/index> (acesso em 19/06/2009).



World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Expert Consultation on Obesity. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. Geneva, World Health Organization. 2000; Technical Report Series- 894.

Yager JD. Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000; (27): 67-73.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptor that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003; 423: 762-769.

Yang RZ, Lee MJ, Hu H, Pollin TI, Ryan AS, Nicklas BJ, et al. Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine and potential link between obesity and its metabolic complications. *PLoS Med.* 2006; 3(6): 287.

Yee, D, Lee, AV. Crosstalk between the insulin – like growth factors and estrogens in breast cancer. *Journal of the mammary Gland Biology & Neoplasia.* 2006 5: 107-115.

Zhao Y, He X, Shi X, Huang C, Liu J, Zhou S et al. Association between serum amyloid A and obesity: a meta-analysis and systematic review. *Inflamm. Res.* 2010; 59: 323–334.

Zorlini R, Akemi ABE, Cairo A, Gurgel SMC. Nutritional status of patients with gynecologic and breast cancer. *Nutr Hosp.* 2008; 23 (6): 577-583.

***8- ANEXOS***

### 8.1. Anexo I – Check List

Check List		
<b>Nome:</b>		<b>N° do Caso:</b>
<b>HC:</b>		
<b>Crítérios Inclusão</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
Ca mama invasor	( )	( )
Pós menopausa	( )	( )
IMC $\geq$ 18,5 kg/m <sup>2</sup>	( )	( )
<b>Crítérios Exclusão</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>
Biópsia excisional prévia	( )	( )
Qt. Prévia	( )	( )
Rt. Prévia	( )	( )
Outro câncer	( )	( )
Doença reumatológica	( )	( )
Doença alérgica	( )	( )
Infecção recente (até 15 dias)	( )	( )
Vacina recente (até 15 dias)	( )	( )
Doença pulmonar crônica	( )	( )
Imunossupressão	( )	( )
Cardiopatía grave	( )	( )
Reposição Hormonal	( )	( )

( ) <b>Incluído</b>	( ) <b>Não Incluído</b>
---------------------	-------------------------



## 8.2. Anexo II - TCLE

Termo de consentimento pós – informação a ser obtida das pacientes, redigido de acordo com as resoluções 196/96 e 347/05, para participação no estudo intitulado:

**SAA e adiponectina – caracterização no câncer de mama na fase pós-menopausa e relação com obesidade**

Nome do paciente: .....

Idade:.....anos    RG:.....    HC:.....

Endereço:.....  
.....  
.....

Nome do responsável legal (se paciente incapacitado): .....

.....

RG:..... Grau de parentesco: .....

Endereço:.....  
.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume: 15 ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Sei que posso sentir dor de pequena intensidade e de curta duração no local e no momento da coleta de sangue. Sei também que não terei outros prejuízos com a realização deste exame. Estou ciente de que este sangue será utilizado para a avaliação da quantidade de algumas proteínas que podem estar alteradas por causa do câncer de mama. Isso ainda não está comprovado. Estou ciente que um pedaço do tumor retirado durante a minha cirurgia para tratamento do câncer será examinado para a avaliação de características próprias deste tumor e que **isso faz parte da rotina do serviço**. Outro pequeno pedaço da mama retirada na cirurgia será utilizado para o estudo das mesmas proteínas que serão pesquisadas no

sangue. Estou ciente que uma pequena parte do segundo pedaço será congelado, em caso dos resultados do estudo atual necessitarem complementação ou confirmação com outra metodologia. **Sei que posso não autorizar esse congelamento.** Sei que posso sentir dor no local da extração, após passar o efeito do anestésico utilizado. **O resultado do exame do tumor será colocado no meu prontuário médico.** Estou ciente que as informações relativas ao meu peso, altura, medida da cintura e quadril e também relativas aos meus hábitos alimentares e de atividade física serão utilizadas nesse estudo. **Estou ciente de que não terei prejuízos nem benefícios com a participação nesse estudo.** No entanto, caso esse estudo auxilie no entendimento da causa ou da gravidade do câncer de mama, outras pessoas poderão se beneficiar no futuro. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto **não vai prejudicar** o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Sílvia de Barros Mazon, do Departamento de Patologia Clínica, Tel: 3521-9435, 3521-7064. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/UNICAMP. Tel: 3521- 8936. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

**Assinatura do paciente**

.....

**Assinatura do responsável legal**

.....

**Assinatura do pesquisador legal**

Campinas,..... / ..... / .....

### 8.3. Anexo III - Questionário

#### COLETA DE DADOS

#### QUESTIONÁRIO

NOME: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_\_ anos

HC: \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_ - \_\_\_\_ DATA CIRURGIA: \_\_\_\_\_

DATA NASCIMENTO:	CA:
PESO:	QUADRIL:
ALTURA:	RCQ:
IMC:	MENOPAUSA:
DOENÇAS ASSOCIADAS:	MEDICAMENTOS:
ESCOLARIDADE:	ESTADO CIVIL:

FATORES RACIAIS:  ( 1 ) caucasóide

( 2 ) parda

( 3 ) negra

( 4 ) amarela

IDADE AO DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_ anos

FATORES HISTOPATOLÓGICOS:

CA DUCTAL  CA LOBULAR  OUTROS: \_\_\_\_\_

**GH:**  1  2  3 **GN:**  1  2  3

**RE:** ( + ) ( - ) **RP:** ( + ) ( - ) **C-HERB B2:** (0/+) (++) (+++)

ESTADIAMENTO:

**T:** **N:** **M:** **ECp:** \_\_\_\_\_

RESULTADOS LABORATORIAIS:

SAA sérica: SAA tecidual: (0/+) (++) (+++) ADIPONECTINA sérica:

ADIPONECTINA tecidual: (0/+) (++) (+++)

COL -TOTAL:

GLICEMIA:LDL-COL:

HDL-COL:

TG:

## Hábitos Alimentares e de Atividade Física

1. Consumo de gorduras (carnes, frituras, etc):  (S-I)  (S-C)  (N)

2. Consumo de carboidratos (massas, pães, etc):  (S-I)  (S-C)  (N)

3. Consumo de açúcar (doces, balas, refrigerantes, etc):  (S-I)  (S-C)  (N)

SIM- SEM CONTROLE (S-I):

SIM- COM CONTROLE (S-C):

NÃO (N):

Comentários: \_\_\_\_\_

*Obs: A avaliação dos hábitos alimentares leva em consideração a frequência do consumo de porções médias determinadas para uma dieta equilibrada.*

**Frequência:** Sim sem controle (S-I): consome 2 ou mais vezes ao dia; Sim com controle (S-C): consome de 1 a 4 vezes na semana. Não (N): não consome.

**Quantidades:** Porções médias determinadas para uma dieta equilibrada: Ex: Gorduras (maionese tradicional: 1 colher de sopa; carne/frituras: 1 unidade medi. Carboidratos: arroz cozido: 4 colheres de sopa; massas: 1 prato raso; pão francês: meia unidade; pizza: 1 fatia média. Açúcares: açúcar adicionado em café, chá, leite, etc: 2 colheres de sobremes; sorvete: 2 bolas ou 1 unidade.

*Adaptado de Fisberg et al. Inquéritos Alimentares-Métodos e Bases Científicos, 2005.*

4. Sedentarismo:  (S)  (M)  (N)

SIM (S) : Não realiza nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana.

MODERADO (M) Realiza atividade física vigorosa e/ou moderada < 3 dias/sem e por 10 a 150 minutos/semana.

NÃO (N): Indivíduo que realiza atividade vigorosa  3 dias/sem e  20 minutos consecutivos ou atividade moderada  5 dias/sem e  30 minutos consecutivos

Comentários: \_\_\_\_\_

*Obs.: Essa classificação leva em consideração o tipo de atividade física, a frequência (dias/semana) e a duração (min/semana) mínimas da realização da atividade. Tipo de Atividades Físicas: Vigorosas: Atividades físicas que exigem grande esforço físico e que aceleram a frequência respiratória muito acima da normal. Ex.: subir escadas, esfregar o chão, correr.*

**Moderadas:** Atividades físicas que exigem algum esforço físico e aceleram a frequência respiratória um pouco acima da normal Ex.: carregar pesos leves, varrer o chão, hidroginástica. Adaptado do IPAQ – International Physical Activity Questionnaire- <http://www.ipaq.ki.se/>.