

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

JULIANO SARTORI

**GRAU DE EXPRESSÃO DA SIRTUÍNA-1 (SIRT-1) EM TECIDO TUMORAL DE
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA: VALOR PROGNÓSTICO
INDEPENDENTE OU ASSOCIADO A VARIÁVEIS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS**

PORTO ALEGRE

2016

JULIANO SARTORI

**GRAU DE EXPRESSÃO DA SIRTUÍNA-1 (SIRT-1) EM TECIDO TUMORAL DE
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA: VALOR PROGNÓSTICO
INDEPENDENTE OU ASSOCIADO A VARIÁVEIS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Gerontologia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Prof. Rodolfo Herberto Schneider

PORTO ALEGRE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S251g Sartori, Juliano

Grau de expressão da sirtuína-1 (sirt-1) em tecido tumoral de mulheres com câncer de mama: valor prognóstico independente ou associado a variáveis clínicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas / Juliano Sartori – Porto Alegre, 2016.

188 f.: il.; tab. Inclui dois artigos científicos.

Tese (Doutorado em Gerontologia Biomédica) – Instituto de Geriatria e Gerontologia, PUCRS.

Orientador: Dr. Prof. Rodolfo Herberto Schneider.

1. Medicina. 2. Neoplasias da Mama. 3. Sirtuína 1. 4. Sobrevida.
5. Carcinogênese. 6. Repressão Epigenética. 7. Prognóstico. 8. Imuno-Histoquímica. I. Schneider, Rodolfo Herberto. II. Título.

CDD 618.19
CDU 618.19-006
NLM WP 870

Ficha Catalográfica elaborada por Vanessa Pinent
CRB 10/1297

JULIANO SARTORI

**GRAU DE EXPRESSÃO DA SIRTUÍNA-1 (SIRT-1) EM TECIDO TUMORAL DE
MULHERES COM CÂNCER DE MAMA: VALOR PROGNÓSTICO
INDEPENDENTE OU ASSOCIADO A VARIÁVEIS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Gerontologia Biomédica, pelo Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 02/12/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Carla Helena Augustin Schwanke
PUCRS

Prof^o Dr^o Felipe Pereira Zerwes
PUCRS

Prof^a Dr^a Alice de Medeiros Zelmanowicz
Fundação Universidade Federal Ciências da Saúde de Porto Alegre

Porto Alegre
2016

AGRADECIMENTOS

À família, pelo estímulo, disponibilidade, carinho, apoio e cuidado, dispensados em cada passo desta caminhada.

À equipe do Centro de Oncologia Clínica Erechim, pela colaboração e apoio incondicional em todos os momentos.

À equipe do Centro de Radioterapia Alto Uruguai, pela colaboração e disponibilidade.

À equipe do Laboratório de Patologia Medicina Diagnóstica Erechim, pelo profissionalismo e organização.

Ao professor Rodolfo Schneider, pela amizade, apoio, simplicidade e sabedoria, que foram fundamentais nesta construção.

À equipe do programa de pós-graduação em Gerontologia Biomédica, pela acolhida, competência e profissionalismo demonstrados.

Ao professor Antônio Frasson, pela confiança e apoio, que foram motivadores deste trabalho.

Ao professor Mario Wagner, pelas análises estatísticas.

À Ivete, pelo apoio metodológico.

À vocês, Giana, Louise e Augusto, pelo respeito, compreensão, segurança, alegria inspiradora e amor, demonstrados nesta caminhada.

RESUMO

Apesar dos avanços decorrentes da caracterização molecular do câncer de mama que permitiram o emprego de alvos terapêuticos mais seletivos, a doença ainda ocasiona diferentes desfechos clínicos, com elevadas taxas de recidiva e mortalidade. Neste contexto de complexidade e heterogeneidade do câncer de mama, são importantes as investigações de novos marcadores biomoleculares relacionados à oncogênese mamária que possam contribuir para conhecer o prognóstico e aprimorar o manejo clínico das pacientes. A Sirtuína-1 (SIRT-1) é uma histona desacetilase implicada em diversas funções epigenéticas críticas para as células, dentre estas, a manutenção da estabilidade genômica, a proliferação e o envelhecimento celular. O objetivo deste estudo foi investigar o grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) em uma coorte de 457 mulheres portadoras de câncer de mama e verificar o seu efeito, independente ou em associação a outras variáveis, no prognóstico destas pacientes. Trata-se de um estudo de análise de sobrevida com base em registros de mulheres portadoras de câncer de mama submetidas a tratamento em Erechim-RS no período de 2003 a 2013 com seguimento até 31 de julho de 2015. A análise do grau de expressão de SIRT-1 foi realizada por técnica de imuno-histoquímica em 123 pacientes (26,9%) do total da coorte. A sobrevida global doença específica foi estimada pelo método de Kaplan-Meier e, o risco de morte, por câncer de mama, pelo método de riscos proporcionais de Cox. A pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética e Pesquisa da PUC-RS, sob nº 465.362. A idade mediana foi de 57,4 anos e a estimativa mediana de sobrevida por câncer de mama foi de 79,6% em 5 anos e 69,1% em 10 anos, com tempo mediano de seguimento de 61,9 meses. Os fatores de risco associados a pior prognóstico foram: faixa etária entre 60 e 69 anos (HR=1,88; IC95% 1,02-3,44; $p=0,042$); faixa etária maior que 70 anos (HR=2,92; IC95% 1,70-5,01; $p=0,000$); tamanho tumoral acima de 2 cm (HR=1,86; IC95% 1,04-3,36; $p=0,038$); presença de metástase em 4 linfonodos axilares ou mais (HR=2,37; IC95% 1,38-4,08; $p=0,002$); estadiamento clínico localizado (EC II,TNM) (HR=3,39; IC95% 1,35-8,51; $p=0,009$); estadiamento clínico avançado (EC III,TNM) (HR=6,32; IC95% 2,49-16,08; $p=0,000$); grau histológico alto (HR=6,32; IC95% 1,63-29,99; $p=0,008$); perfil molecular triplo negativo (HR=2,33; IC95% 1,19-4,58; $p=0,014$) e a cirurgia radical (HR=2,10; IC95% 1,31-3,36;

$p=0,002$). A expressão positiva do receptor de progesterona (HR=0,52; IC95% 0,34-0,79; $p=0,002$) foi um fator de melhor prognóstico para as pacientes. O grau de hiperexpressão da SIRT-1, definida como expressão nuclear da SIRT-1 maior que 80%, foi verificada em 6,5% dos casos. A hiperexpressão da SIRT-1 caracterizou um subgrupo de mulheres que apresentaram pior prognóstico, com menor sobrevida e maior risco de morte por câncer de mama (HR=2,66; IC95% 1,03-6,86; $p=0,043$). Foram elaborados modelos regressivos multivariados (Cox) e a hiperexpressão de SIRT-1 manteve significância estatística demonstrando fator independente associado a pior prognóstico no câncer de mama. Portanto, a avaliação do grau de expressão da SIRT-1, na coorte de Erechim-RS, demonstrou ser um marcador independente para determinar o prognóstico no câncer de mama.

Palavras-chaves: Medicina. Neoplasias da Mama. Sirtuína 1. Sobrevida. Carcinogênese. Repressão Epigenética. Prognóstico. Imuno-Histoquímica

ABSTRACT

Despite the advances resulting from the molecular characterization of breast cancer that allowed the use of more selective therapeutic targets, the disease still causes different clinical outcomes with high rates of recurrence and mortality. In this context of complexity and heterogeneity of breast cancer, are important the investigations of new biomolecular markers related to breast oncogenesis that may contribute to know the prognosis and improve the clinical management of patients. The sirtuin-1 (SIRT-1) is a histone deacetylase implicated in various epigenetic critical functions into cells, among these, the maintenance of genomic stability, proliferation and cell aging. The aim of this study was to investigate the grade of expression of the sirtuin-1 (SIRT-1) in a cohort of 457 women with breast cancer and verify the effect, independent or in combination with other variables in the prognosis of these patients. It is a survival analysis study based on hospital medical records of women with breast cancer undergoing treatment in Erechim-RS from 2003 to 2013 and followed until 31 July 2015. The analysis of the grade of SIRT-1 expression was performed by immunohistochemistry in 123 patients (26.9%) of the total cohort. Overall survival specific disease (OS) was estimated by the Kaplan-Meier method and the risk of death from breast cancer by the method of Cox proportional hazards. The research was approved by the Research Ethics Committee of PUC-RS as reported number 465.362. The median age was 57.4 years and the median estimate of breast cancer survival was 79.6% at 5 years and 69.1% at 10 years, with median follow-up time of 61.9 months. Risk factors associated with worse prognosis were: age between 60 and 69 years (HR = 1.88; 95% CI 1.02 - 3.44; $p = 0.042$); older than 70 years (HR = 2.92; CI 95% 1.70 - 5.01; $p = 0.000$); tumor size greater than 2 cm (HR = 1.86; CI 95% 1.04 - 3.36; $p = 0.038$); metastasis in 4 or more axillary lymph nodes (HR = 2.37; CI 95% 1.38 - 4.08; $p = 0.002$); located clinical staging (CS II, TNM) (HR = 3.39; CI 95% 1.35 - 8.51; $p = 0.009$); advanced clinical staging (CS III, TNM) (HR = 6.32; CI 95% 2.49-16.08; $p = 0.000$); high histologic grade (HR = 6.32; CI 95% 1.63 - 29.99; $p = 0.008$); triple negative molecular profile (HR = 2.33; CI 95% 1.19 - 4.58; $p = 0.014$) and radical surgery (HR = 2.10; CI 95% 1.31 - 3.36; $p = 0.002$). The positive expression of progesterone receptor (HR = 0.52, CI 95% 0.34 - 0.79; $p = 0.002$) was a better prognostic factor for patients. The grade of overexpression of SIRT-1,

defined as nuclear expression of SIRT-1 greater than 80% was observed in 6.5% of cases. The SIRT-1 overexpression characterized a subgroup of women who had a worse prognosis with shorter survival and increased risk of death from breast cancer (HR = 2.66; CI 95% 1.03 - 6.86; $p = 0.043$). Multivariate regressive models (Cox) were constructed and the overexpression of SIRT-1 remained significant statistic demonstrating independent factor associated with worse prognostic in breast cancer. Therefore, the evaluation of the grade of expression of the SIRT-1, in the cohort of Erechim-RS, proved to be an independent prognostic marker for analysis of the risk of death from breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Sirtuin 1. Survival. Carcinogenesis. Repression epigenetics. Prognosis. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelos hipotéticos que explicam a heterogeneidade intratumoral e evolução do tumor.....	24
Figura 2 - Modelos hipotéticos explicando subtipos de tumor de mama.	26
Figura 3 - Classificação do carcinoma de mama segundo perfil gênico e diferenciação celular.	27
Figura 4 - Correlação das características genômicas e clínicas com as mutações gênicas.....	28
Quadro 1 - Inibição da descacetilação das histonas: mecanismos de ação na terapia do câncer.....	33
Figura 5 - Papel da SIRT-1 na Oncogênese celular.....	34
Figura 6 - Sirtuínas e sobrevivência celular.	35
Figura 7 - Desenho Esquemático da Pesquisa	48
Quadro 2 - Descrição esquemática das variáveis para o banco de dados.....	51
Figura 8 - Esquema do desenho e fluxograma da pesquisa para composição da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama e investigação das variáveis de interesse.....	56
Figura 9 - Histograma do tempo de seguimento em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama.....	57
Figura 10 - Histograma da distribuição das idades em anos da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama.....	58
Figura 11 - Curva de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses das pacientes portadoras de câncer de mama durante o tempo de seguimento da coorte estudada.....	64
Figura 12 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama estratificadas de acordo com a faixa etária.....	66

Figura 13 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a Histologia	68
Figura 14 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama segundo tamanho do tumor	70
Figura 15 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama segundo o comprometimento metastático dos linfonodos axilares.....	72
Figura 16 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama classificadas de acordo com o Estadiamento Clínico (TNM)	74
Figura 17 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o grau histológico do tumor	76
Figura 18 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil da expressão dos receptores de estrogênio (RE)	78
Figura 19 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil da expressão dos receptores de progesterona (RP).....	79
Figura 20 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil de expressão dos receptores hormonais (RH).....	81
Figura 21 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil de expressão do Her-2.....	82
Figura 22 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o grau de expressão do índice de proliferação celular (Ki-67)	84
Figura 23 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil molecular.....	86

Figura 24 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o tipo de cirurgia realizada	88
Figura 25 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não de quimioterapia adjuvante	89
Figura 26 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não de radioterapia adjuvante	91
Figura 27 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não de hormonioterapia adjuvante	92
Figura 28 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não da terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin®	94
Figura 29 – Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão fraca da SIRT-1 (grau de expressão de 40%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.....	98
Figura 30 - Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão moderada da SIRT-1 (grau de expressão de 70%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.....	99
Figura 31 - Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão forte da SIRT-1 (grau de expressão de 80%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.....	99
Figura 32 - Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão forte da SIRT-1 (grau de expressão de 90%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.....	100
Figura 33 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com expressão de Sirtuína-1 (SIRT-1)	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição e frequência das variáveis pesquisadas no ingresso na coorte e eventos (mortes) ocorridos durante o tempo de seguimento das pacientes.	62
Tabela 2 - Análise Univariada das variáveis prognósticas para a ocorrência de morte na coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama	94
Tabela 3 - Descrição e frequência das variáveis pesquisadas para composição da coorte total e coorte da SIRT-1	96
Tabela 4 - Descrição do grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) em pacientes portadoras de câncer de mama e número de eventos (mortes) ocorridos durante o seguimento.....	100
Tabela 5 - Análise Univariada da SIRT-1 ajustada para ocorrência de morte de acordo com a descrição de cada variável prognóstica na coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama	104
Tabela 6 - Análise Multivariada da SIRT-1 ajustada para ocorrência de morte de acordo com as variáveis prognósticas agrupadas em modelos específicos na coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AJCC – Do inglês, *American Joint Committee on Cancer*
- AR - Ano de registro
- BPS – Laboratório *Bioscience*
- C50 – Classificação estatística das neoplasias malignas da mama
- CIR – Tratamento cirúrgico
- CID – Classificação estatística internacional de doenças e problemas relacionados à saúde
- CO - Causa do óbito
- COC - Centro de Oncologia Clínica Erechim
- Cox – Modelo estatístico de riscos proporcionais ou regressão
- D1 – Do inglês, *cyclin D1 protein*
- DBC1 – Do inglês, *deleted in breast cancer 1*
- DD - Data do diagnóstico
- DIT - Data de início de tratamento
- DNA - *Ácido desoxirribonucleico*
- DNMT1 – Do inglês, *DNA metiltransferase 1*
- DO - Data do óbito
- DPC - Data da 1ª consulta
- DtN - Data de nascimento
- DUC - Data da última consulta realizada
- E - Do inglês, *cyclin E protein*
- EC - Estadiamento clínico
- FHSTE - Fundação Hospitalar Santa Terezinha de Erechim
- FISH – Do inglês, *fluorescence in situ hybridization*
- GBECAN – Grupo Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama
- GH - Grau histológico
- HCE – Hospital de Caridade de Erechim
- HDACs - *Histonas acetilases*
- HER-2 - Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
- HR – Do inglês, *hazard ratio*, risco relativo
- HIV - vírus da imunodeficiência humana

I – Idade

INK4a/ARF – Do inglês, *locus on chromosome 9p21*

IGG – Instituto de Geriatria e Gerontologia

KATs - *Lisinas acetiltransferases*

Ki 67 - Índice de proliferação celular

Ln - Linfonodos axilares

Mtx - Metástase

NAD+ - *Nicotinamida adenina dinucleotídeo*

NGS - Sistema de Classificação Nottingham

NRg - Número de registro geral

NRLp - Número do registro Laboratório de Patologia

PI3K – Do inglês, *fosfatidilinositol 3-quinase*

P53 – Do inglês, *protein 53*

QtX - Quimioterapia

RE - Receptor de estrogênio

RH - Receptor de hormônios

RP - Receptor de progesterona

Rtx – Radioterapia

SAME - Serviço de Arquivo Médico

SIRT-1 – Sirtuína 1

SIRT-2 – Sirtuína 2

Sir2 – Do inglês, *silent information regulator 2, protein deacetylases*.

SUS – Sistema Único de Saúde

T - Tamanho do tumor

TBX2/3 - Do inglês, *T-box transcription factor 2/3*

TH - Tipo histológico

TNM - Classificação de Tumores Malignos

UICC - União Internacional Contra o Câncer

V – Vivo

VEGF - Do inglês, *Vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 O CÂNCER DE MAMA.....	21
2.1.1 A heterogeneidade do câncer de mama.....	23
2.1.2 Os subtipos moleculares no câncer de mama	25
2.1.3 O envelhecimento e o câncer de mama	29
2.2 EPIGENÉTICA - AS SIRTUÍNAS	30
2.2.1 A Sirtuína-1 (SIRT-1).....	34
3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMAS DA PESQUISA	37
4 HIPÓTESES	38
5 OBJETIVOS	39
5.1 OBJETIVO GERAL	39
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6 MÉTODOS	41
6.1 DELINEAMENTO	41
6.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA	41
6.2.1 Descrição dos locais da pesquisa	42
6.2.2 Cálculo amostral	43
6.2.3 Critérios de inclusão	44
6.2.4 Critérios de exclusão	44
6.3 LOGÍSTICA DO ESTUDO	45
6.3.1 Descrição da técnica para realização da pesquisa de Sirtuína-1 (SIRT-1) nos blocos de parafina selecionados:.....	46
6.3.2 Locais e início das atividades	47
6.3.3 Desenho da pesquisa.....	48
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
6.4.1 Banco de dados e descrição das variáveis.....	49
6.4.2 Modelo epidemiológico – análise de sobrevida	51
6.4.3 Variáveis biológicas.....	52
6.4.4 Análise do grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1)	53
6.4.5 Análise estatística	54
6.4.6 Metodologia da análise	54
6.5 ASPECTOS ÉTICOS.....	55
7 RESULTADOS	56
8 DISCUSSÃO	106
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	132

10 CONCLUSÕES	135
REFERÊNCIAS.....	136
ANEXOS	146
APÊNDICES	185

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença progressiva com características clínicas e biológicas heterogêneas que se constitui em um relevante problema de saúde pública mundial, pois apresenta taxas elevadas de incidência, morbidade e mortalidade (SHIOVITZ, KORDE, 2015; HORTOBAGYI et al., 2016). O envelhecimento humano, o crescimento demográfico populacional e a exposição aos fatores de risco estão associados com o aumento de novos casos de câncer implicados em um processo de oncogênese complexo que é mediado por diversos fatores biológicos, e dentre eles, os fatores genéticos e epigenéticos (POLYAK, 2007; SHIOVITZ, KORDE, 2015).

Neste cenário, o câncer de mama assume real importância, pois além de ser a neoplasia maligna mais frequente nas mulheres e, com, elevadas taxas de mortalidade no Brasil e no Mundo, apresenta uma complexidade de fatores gênicos e moleculares relacionados à sua patogênese (BRASIL, 2016; SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016; TAN, MOK, REBBECK, 2016). O câncer de mama tem seu prognóstico e tratamento baseados em diversos fatores biológicos: idade, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos axilares, presença de metástases, grau histológico, perfil de expressão dos receptores hormonais, perfil de expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (Her-2) e do índice de proliferação (Ki-67), que conferem assinaturas gênicas, próprias a esta doença (SOTIRIOU, PHIL, PUZSTAI, 2009; KOBOLDT et al., 2012; CARVALHO, 2007; SENKUS et al., 2015).

Apesar dos avanços nas estratégias utilizadas no tratamento do câncer de mama, a etiologia molecular da iniciação do tumor, a progressão tumoral e os mecanismos de resistência às drogas, ainda requerem melhor compreensão para otimizar as intervenções e, conseqüentemente, reduzir a mortalidade (WILTING, DANNENBERG, 2012; HARTWIG et al., 2014; SHIOVITZ, KORDE, 2015).

Neste complexo cenário da oncogênese mamária, os fatores epigenéticos, desempenham papel importante pois, são eventos moleculares envolvidos em diversas atividades fisiológicas das células, sendo fundamentais para a regulação da

expressão gênica (LOCKE, CLARK, 2012). Dentre as principais funções celulares envolvidas na programação epigenética estão o crescimento, a diferenciação, o envelhecimento e a apoptose (HALL et al., 2013). Estas funções são etapas vitais para a organização e metabolismo das células e, conseqüentemente, para a configuração da própria identidade celular (HARTWIG et al., 2014).

Os processos genéticos e epigenéticos, quando alterados ou desregulados, podem estar relacionados com a etiologia e patogenia de múltiplas doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento e dentre estas, o câncer (HAIGIS, GUARENTE, 2006; LOCKE, CLARK, 2012; SHIOVITZ, KORDE, 2015).

Muitos mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese ainda são desconhecidos, porém as alterações na acetilação e desacetilação das histonas, especificamente, em moléculas da família das sirtuínas (Sir2), têm sido estudados e relacionados com a carcinogênese (BLANDER, GUARENTE, 2012; PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011; HALL et al., 2013).

As sirtuínas são moléculas protéicas intracelulares, da classe III das histonas desacetilases, e foram identificadas, inicialmente, em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (DALI-YOUCHEF et al., 2007; BLANDER, GUARENTE, 2012). Em humanos, representam um grupo de proteínas compostos por sete membros com funções metabólicas distintas, sendo fundamentais para a manutenção da homeostase celular e relacionadas diretamente com o processo de silenciamento celular (CHACKRABARTY, BALARAM, CHANDRASEKARAN, 2011; PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015).

As alterações na expressão celular destas moléculas e, especificamente, da sirtuína-1 (SIRT-1), têm sido correlacionadas com alguns processos da carcinogênese mamária, nos mecanismos reguladores da expressão dos receptores hormonais e associados à maior agressividade biológica tumoral (HAIGIS, GUARENTE, 2006; CHACKRABARTY, BALARAM, CHANDRASEKARAN, 2011).

Neste contexto, pesquisas que procuram identificar alterações moleculares relacionadas à oncogênese mamária, em associação com os fatores epidemiológicos, clínicos e patológicos clássicos, possibilitarão compreender melhor as interações e as implicações na evolução da doença e, conseqüentemente, no impacto da sobrevida das pacientes (MAROUS et al., 2015). A descoberta de novos marcadores biológicos, prognósticos ou preditivos, poderão contribuir para

identificação de grupos específicos de pacientes que poderão ter benefícios no seu manejo clínico oncológico (HWANG et al., 2014).

Além disto, novos estudos poderão ser úteis para embasar um modelo teórico racional para o desenvolvimento de novos agentes moleculares que, isolados ou associados, serão capazes de reverter os processos relacionados à iniciação, progressão e resistência das neoplasias malignas, dentre estas, do câncer de mama (CHACKRABARTY, BALARAM, CHANDRASEKARAN, 2011; BALLMAN, 2015; TAN, MOK, REBBECK, 2016).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama constitui-se numa doença heterogênea, com retratos moleculares distintos, que segue despertando muito interesse mundial em pesquisas biomédicas que buscam a compreensão sobre os processos biológicos e moleculares envolvidos na oncogênese, evolução e mecanismos de resistência das células tumorais (POLYAK, 2007; SHIOVITZ, KORDE, 2015; TAN, MOK, REBBECK, 2016). A compreensão destes processos permitirão reconhecer as melhores estratégias preventivas e a descoberta de novas terapêuticas alvo para a doença. As pesquisas epidemiológicas são essenciais para fornecer informações relevantes que possam gerar ações visando uma mudança no cenário do câncer de mama e, conseqüentemente, reduzindo a mortalidade e o impacto socioeconômico que a doença ocasiona às pacientes e à sociedade (MAROUS et al., 2015).

Dados epidemiológicos revelam que o câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente na Europa e nos Estados Unidos, sendo a segunda causa de morte por câncer nas mulheres (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016). Está relacionada com o processo de envelhecimento e representa 30% de todos os cânceres mundiais (HURRIA et al., 2015). Na Europa foram estimados 464.000 novos casos de câncer de mama com 131.000 óbitos em decorrência da doença no ano de 2012 e nos Estados Unidos, no ano de 2016, estima-se aproximadamente 246.660 novos casos de câncer de mama em mulheres e 40.450 mortes decorrentes da doença (SHIOVITZ, KORDE, 2015; SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016). O custo social e o impacto econômico que a doença representa aos orçamentos públicos e privados de saúde são muito elevados. Nos Estados Unidos, para o período de 2010 a 2020, foram estimados 13,8 e 18,1 milhões de casos de câncer, sendo que para o período estimou-se 3,46 milhões de novos casos de câncer de mama. Assumindo que a incidência, a sobrevida e os custos sejam constantes, foi projetado um custo de

saúde de U\$ 124,57 bilhões e U\$ 157,77 bilhões, respectivamente, para os períodos acima mencionados (MARIOTTO et al., 2011).

No Brasil, para o ano de 2016, foram estimados 596 mil novos casos de câncer, sendo esperados para este ano 57.960 casos de câncer de mama conforme relatório publicado pelo Instituto Nacional do Câncer (BRASIL, 2016). Para a região Sul do Brasil, foram estimados 10.970 novos casos de câncer de mama para o ano de 2016, que representam 25% de todos os casos de câncer estimados para as mulheres desta região (BRASIL, 2016).

As estimativas de sobrevida do câncer de mama apresentam divergências e variações mundiais, pois elas estão relacionadas a diversos aspectos como a localização geográfica da população estudada, condição socioeconômica do país, idade, estadiamento clínico e perfil molecular da doença no momento do diagnóstico (JUSTO et al., 2013; DORNELLAS DE BARROS, MOREIRA LEITE, 2015; DEBIASI et al., 2016). Em países desenvolvidos, onde o diagnóstico é realizado em estágios iniciais, a estimativa de sobrevida média mundial em 5 anos é superior a 85%, sendo que no Brasil as taxas de mortalidade e sobrevida são menores (LEE et al., 2012). Demonstrando a importância da classificação dos tumores de mama de acordo com o perfil molecular do tumor e a idade, um estudo norte-americano que investigou as características da população portadoras de câncer de mama, submetidas a tratamento em um centro de referência entre 1982 e 2008, estimou, para as mulheres com perfil molecular triplo negativo, uma probabilidade de sobrevida em 6 anos de 64% para mulheres maiores de 65 anos e, de 59% para menores de 30 anos (LIEDTKE et al., 2013). Na América Latina, foram verificados 114.900 casos de câncer de mama em 2012 e ocorreram 37.000 mortes pela doença, sendo que 30 a 40% dos diagnósticos foram realizados em estágios avançados (JUSTO et al., 2013). No Brasil, o estudo *Amazona* relatou que somente 20,2% das mulheres são diagnosticadas em estágios iniciais da doença e, a maior parte dos casos, são diagnosticados em estágios mais avançados, com estimativas de sobrevida em 5 anos de 55 a 60% (LEE et al., 2012; SIMON, 2016).

2.1.1 A heterogeneidade do câncer de mama

O câncer de mama não deve ser visto como uma única entidade biológica pois, apresenta um amplo espectro morfológico, biológico, clínico e evolutivo com comportamento e desfechos distintos (POLYAK, 2007; KRAVCHENKO et al., 2011). Estas características heterogêneas do câncer de mama são complexas e decorrentes de inúmeros fatores relacionados à idade, expressão gênica, atividade proliferativa, diferenciação celular e pela atuação de inúmeros genes supressores e promotores (KRAVCHENKO et al., 2011; LIEDTKE et al., 2015). Assim, para explicar a heterogeneidade da doença foram propostos algumas hipóteses com base na fisiologia normal do epitélio da mama, na histologia celular e aspectos moleculares do clone tumoral.

A glândula mamária feminina é um órgão único que sofre uma extensa remodelação e diferenciação mesmo na idade adulta. As alterações hormonais que ocorrem, mensalmente, nas mulheres levam a proliferação em “ondas” das células do epitélio glandular mamário. Neste contexto, alguns estudos sugerem a existência de células tronco epiteliais adultas. Estas células teriam a capacidade de auto-renovação e condições de gerar outros tipos de células diferenciadas. As células geradas poderiam ser de origem luminal, com expressão de receptores hormonais, ou mioepiteliais. Infelizmente, os mecanismos de regulação das vias moleculares de sinalização, responsáveis pela diferenciação das células tronco epiteliais, ainda são desconhecidos (POLYAK, 2007).

As razões desta heterogeneidade intratumoral não estão totalmente esclarecidas, porém dois modelos foram propostos para entender essa evolução (Figura 1). O primeiro modelo (A), denominado “a hipótese da célula tronco cancerígena”, postula que as células neoplásicas são diferenciadas a partir de células tronco epiteliais cancerígenas. As células neoplásicas diferenciadas não teriam a capacidade de divisão e auto-renovação, sendo que, somente as células tronco epiteliais cancerígenas poderiam acumular as alterações genéticas e epigenéticas adicionais gerando progressão da neoplasia e resistência tumoral. O segundo modelo (B), denominado “a hipótese da evolução clonal”, postula que os fenótipos das células tumorais são determinados com base na combinação a partir do tipo de célula de origem e da célula que iniciou a neoplasia, adquirindo as

alterações genéticas e epigenéticas e sinais parácrinos de células vizinhas ao clone tumoral. Neste modelo, todas as células neoplásicas têm a capacidade de divisão e auto-renovação. Os fenótipos celulares não são estáveis podendo se modificar na medida que o carcinoma de mama se desenvolve. Neste caso, todas as células, poderiam contribuir para a progressão tumoral e para o desenvolvimento de mecanismos de resistência tumoral. Os dois modelos propostos não ocorreriam isoladamente e poderia existir a combinação do modelo da célula tronco epitelial e da evolução clonal (POLYAK, 2007).

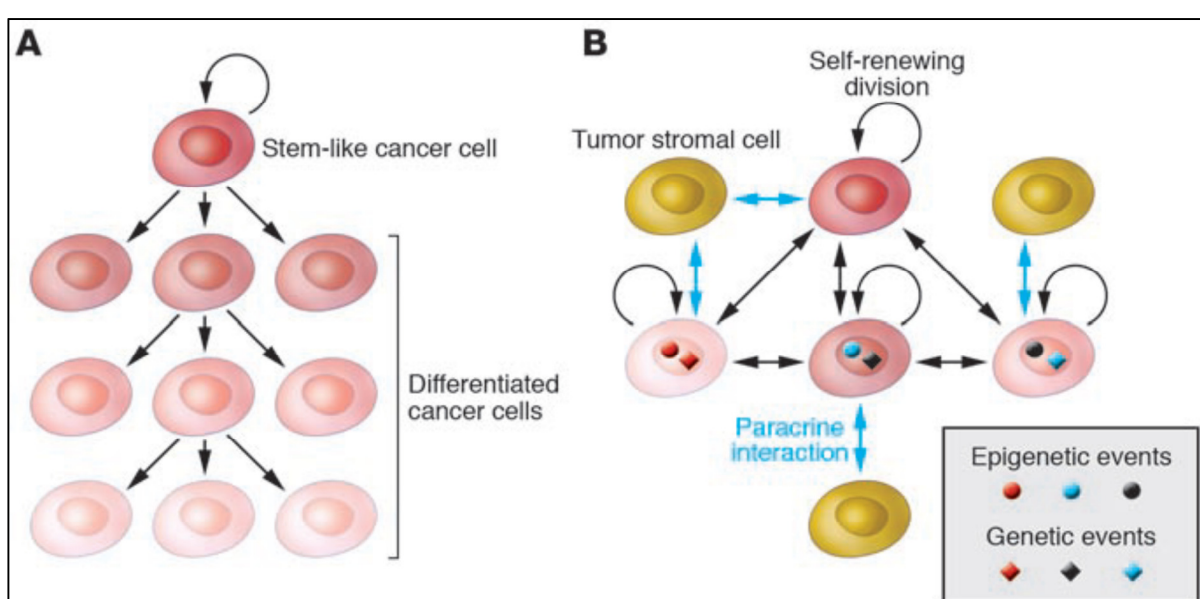


Figura 1 - Modelos hipotéticos que explicam a heterogeneidade intratumoral e evolução do tumor.
Fonte: Polyak (2007).

No passado, as variáveis clássicas, de maior impacto no prognóstico e fundamental para a tomada de decisão no manejo das pacientes, foram o tamanho tumoral, o status do comprometimento dos linfonodos axilares e o perfil de expressão dos receptores hormonais (McHALE et al., 2008; TANEJA et al., 2010). Atualmente, consolidaram-se, definitivamente, como marcadores biológicos e clínicos fundamentais para o tratamento oncológico, a expressão do receptor de estrogênio (RE) e do receptor de progesterona (RP), a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (Her-2) e o índice de proliferação celular (ki-67) (SOTIRIOU, PHIL, PUZSTAI, 2009; LIEDTKE et al., 2015; SENKUS et al., 2015; HARRIS et al., 2016).

2.1.2 Os subtipos moleculares no câncer de mama

Com o desenvolvimento de técnicas de *microarray* de DNA, que é uma técnica que permite que todo o DNA genômico seja fixado em filtro e hibridizado com uma sonda possibilitando o reconhecimento de regiões específicas de cada gene, foram identificados milhares de genes envolvidos nas células tumorais mamárias e que exercem funções distintas (PEROU et al., 2000). A partir deste estudo de referência, no câncer de mama, foram classificados quatro subtipos moleculares que apresentavam características ou assinaturas gênicas próprias. Os critérios utilizados levaram em consideração a expressão de receptores hormonais, estrogênio e progesterona, a expressão do ki-67 e a expressão do Her-2. Os carcinomas de mama foram inicialmente classificados de acordo com a expressão gênica em *luminal-like*, *basal-like*, Her-2 positivo e tipo mama normal (PEROU et al., 2000).

As alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem nas células e as mudanças no microambiente ocasionam uma diversidade intra e intertumoral que determinam a formação dos subtipos moleculares do tumor de mama. A Figura 2, demonstra estes modelos hipotéticos propostos. O modelo **A**, propõe que os subtipos moleculares de câncer poderiam ser originados a partir de células tronco epiteliais diferentes. O modelo **B**, propõe que a origem ocorreria a partir da mesma célula epitelial progenitora. Neste modelo, pode-se presumir que os subtipos moleculares do câncer ocorreriam de acordo com o tipo de eventos genéticos e epigenéticos que acometessem as células nos processos de diferenciação celulares (POLYAK, 2007).

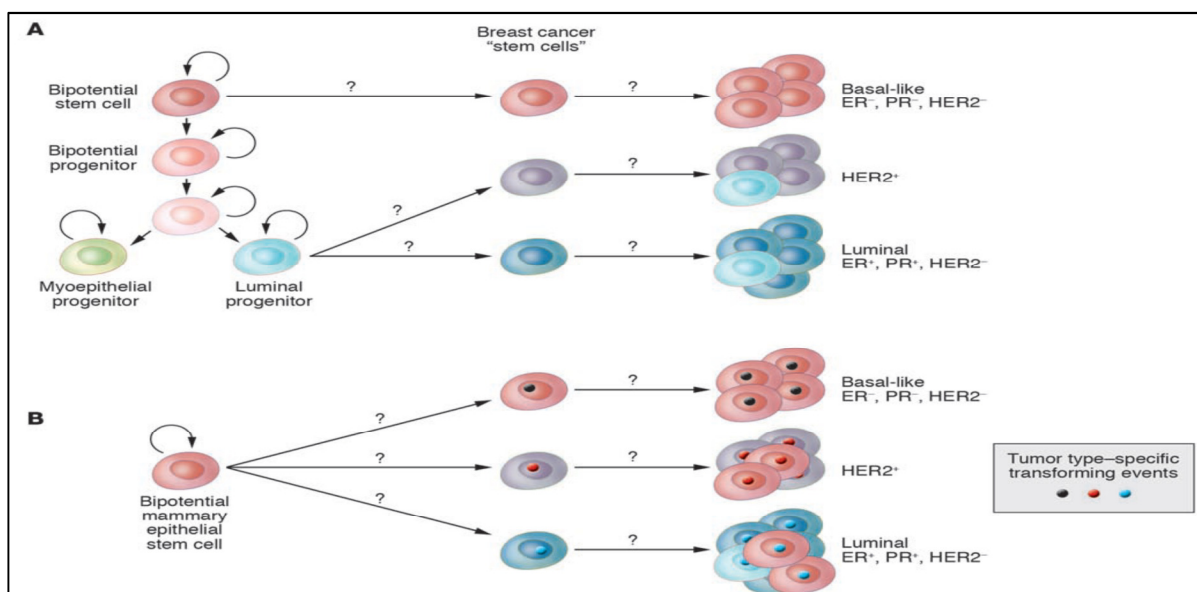


Figura 2 - Modelos hipotéticos explicando subtipos de tumor de mama.
Fonte: Polyak (2007).

Em 2009, uma nova classificação foi proposta tendo analisado o perfil gênico e os desfechos clínicos para cada subgrupo molecular conforme demonstrado na Figura 3 (PARKER et al., 2009; SOTIRIOU, PHIL, PUZSTAI, 2009). As técnicas de classificação a partir de *microarray* de DNA são complexas e não estão disponíveis na maioria dos centros de tratamento de câncer de mama. Assim, as classificações foram sendo realizadas a partir da análise de expressões gênicas dos biomarcadores através da técnica de imuno-histoquímica, que está disponível na maioria dos locais de tratamento e com um custo mais acessível (GOLDHIRSCH et al., 2011; DORNELLAS DE BARROS, MOREIRA LEITE, 2015). Em 2013 e 2015, nos Consensos de St. Gallen, um importante e reconhecido encontro de especialistas, recomendou a nova classificação molecular do câncer de mama que, atualmente, tem sido adotada pela maioria dos especialistas na área (GOLDHIRSCH et al., 2013; COATES et al., 2015).

A Classificação molecular de acordo com o perfil de expressão gênica é a seguinte:

- **Luminal A:** expressão do receptor de estrógeno (RE) positivo, Her-2 negativo, Ki-67 < 14% e receptor de progesterona positivo > 20%;

- **Luminal B Her-2 negativo:** expressão do receptor de estrógeno (RE) positivo, Her-2 negativo, Ki-67 < 14% e/ou receptor de progesterona negativo ou positivo < 20%;

- **Luminal B Her-2 positivo:** expressão do receptor de estrogênio (RE) positiva, Her-2 positivo, Ki-67 < 14% e/ou receptor de progesterona negativo ou positivo < 20%;
- **Her-2 superexpresso (não luminal):** expressão dos receptores de estrogênio e progesterona negativos, Her-2 positivo;
- **Triplo negativo:** ausência de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e Her-2.

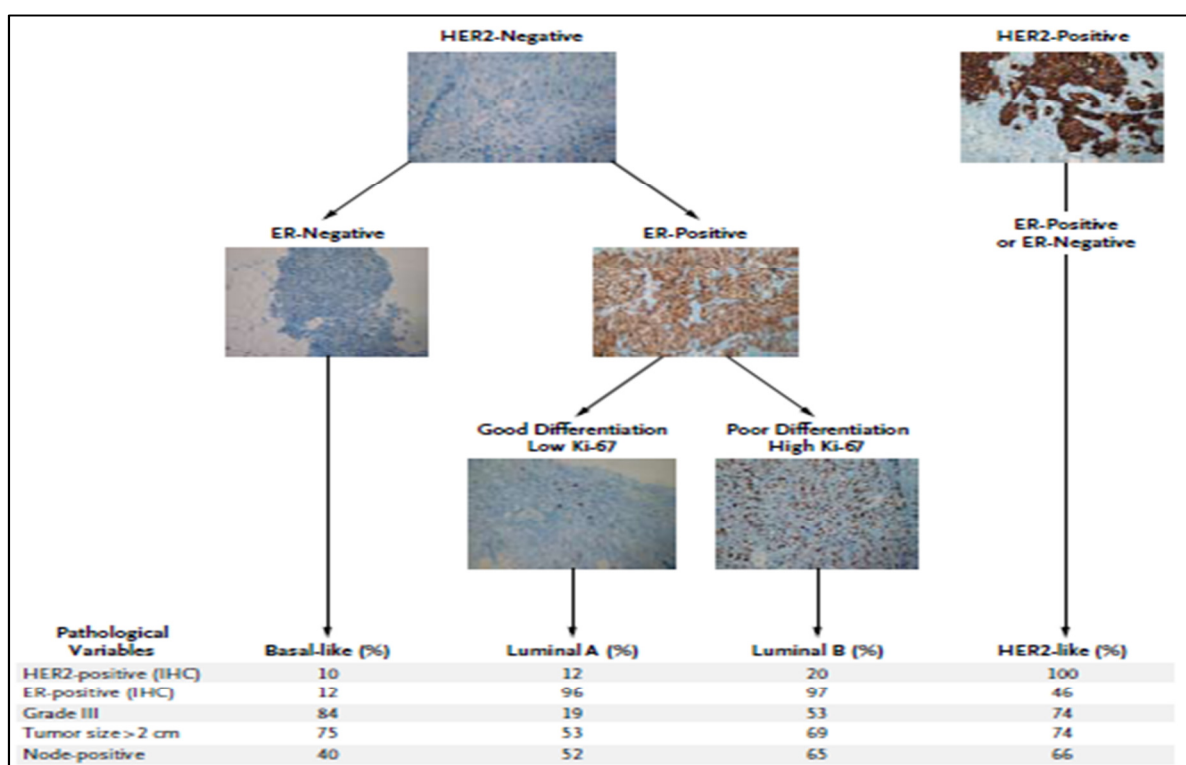


Figura 3 - Classificação do carcinoma de mama segundo perfil genético e diferenciação celular.
Fonte: Sotiriou, Phil, Puzstai (2009).

O arsenal terapêutico disponível para o manejo clínico e cirúrgico das pacientes portadoras de câncer de mama ampliou a partir destes conhecimentos. O tratamento cirúrgico, a radioterapia adjuvante e os tratamentos sistêmicos com quimioterapia, hormonioterapia ou com fármacos alvo-específicos tornaram mais seletivos e personalizados (PARK et al., 2012; HARRIS et al., 2016). Apesar da melhor abordagem e classificação das pacientes avaliando a necessidade de tratamentos adjuvantes de acordo com riscos específicos para cada subtipo de câncer permitindo tratamentos mais efetivos, muitos casos de câncer localizados tem evolução desfavorável com formação de metástases (SENKUS et al., 2015; COATES et al., 2015). O entendimento destes tumores com comportamentos

biológicos agressivos são desafiadores e têm sido atribuídos à complexidade e heterogeneidade de alguns subtipos da doença que apresentam mutações críticas e mecanismos de resistência tumoral (KRAVCHENKO et al., 2011; WOLFF et al., 2014; PARK et al., 2012). Em 2012, um estudo demonstrou a complexidade e o espectro abrangente das mutações que ocorrem nos carcinomas de mama e correlacionou com o perfil clínico molecular da doença, conforme demonstrado na Figura 4 (KOBOLDT et al., 2012).

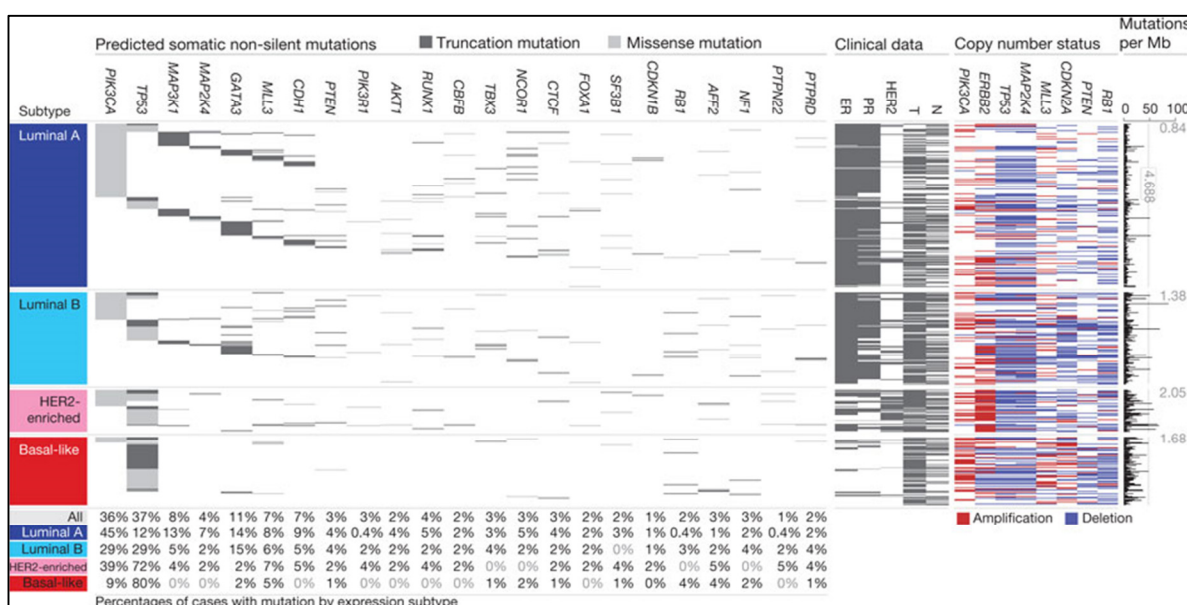


Figura 4 - Correlação das características genômicas e clínicas com as mutações gênicas.

Fonte: Koblodt et al. *Nature* 000, 1-10 (2012).

Neste contexto, estudos que buscam pesquisar alvos específicos no câncer de mama, para personalizar o tratamento oncológico, são de fundamental importância, pois, são mais seletivos e eficazes, com menor ocorrência de toxicidade secundária (POZNAK et al., 2015). Assim, torna-se imprescindível e desafiador, para o manejo das pacientes com câncer de mama, aprimorar o conhecimento da expressão tecidual de genes, dos marcadores de apoptose e proliferação celular e de novos biomarcadores moleculares que possam estar envolvidos na oncogênese mamária (LOCKE, CLARK, 2012). Somente com avanços nos estudos sobre alterações genômicas e epigenômicas da oncogênese mamária será possível entender os diferentes desfechos clínicos que a doença apresenta nas mais diversas populações portadoras de câncer de mama (BYLER et al., 2014).

2.1.3 O envelhecimento e o câncer de mama

O envelhecimento é uma fase do desenvolvimento humano, complexa e heterogênea, em que ocorrem uma série de mudanças em órgãos e sistemas ao longo da vida. Tais alterações podem ocasionar uma redução fisiológica na capacidade de enfrentamento à exposição aos agentes internos ou externos, sejam biológicos ou ambientais (HURRIA et al., 2015). Diante disto, o processo natural de envelhecimento favorece o aparecimento de diversas doenças agudas ou crônicas, dentre elas, o câncer (DECOSTER et al., 2015).

O câncer afeta, principalmente, as pessoas mais velhas, sendo que um terço dos casos são encontrados em indivíduos acima de 70 anos (O'CONNOR et al., 2013; HURRIA et al., 2015). Estimativas para 2030, no Reino Unido, indicam que 76% dos homens e 70% das mulheres com câncer terão idade média superior a 65 anos (HANDFORTH et al., 2015). No Brasil, o envelhecimento da população tem sido apontado como um fator determinante para o aumento no número de casos novos de câncer, dentre estes, o câncer de mama (BRASIL, 2016). Dados revelam que pacientes idosos com câncer são subtratados e sub-representados nos estudos clínicos, quando comparados a pacientes mais jovens (O'CONNOR et al., 2013; HURRIA et al., 2015). A idade cronológica tem sido um fator preditivo de menor tolerância aos tratamentos oncológicos (KUNKLER et al., 2014; HANDFORTH et al., 2015). Desta forma, são necessárias a adoção de estratégias adequadas de acordo com a heterogeneidade e fragilidades da população idosa com câncer, para que os desfechos, pós tratamento, tenham melhores resultados, sem redução nas estimativas de sobrevida.

O câncer de mama nos idosos apresenta características clínicas e biológicas, usualmente, diferentes da população mais jovem que apresentam tipos moleculares com comportamento mais agressivos. A idade avançada, no momento do diagnóstico de câncer de mama, está associado com uma biologia tumoral mais favorável (HURRIA et al., 2015). Os tumores em idosos apresentam maior expressão de receptores hormonais e, conseqüentemente, melhor sensibilidade aos tratamentos com hormonioterapia antineoplásica. Além disto, apresentam menor grau de expressão do Her-2 e no índice de proliferação celular (ki-67) nas células tumorais (LIEDTKE et al., 2013; O'CONNOR et al., 2013). No entanto, os idosos são

mais propensos a apresentar tumores maiores e mais avançados localmente, sugerindo que o comprometimento de linfonodos axilares aumenta com a idade (WILDIERS et al., 2007; LIEDTKE et al., 2013).

Apesar dos inúmeros avanços, em diversas áreas do conhecimento médico e biológico, seguem elevadas as taxas de mortalidade por câncer na população em geral e, especialmente nos idosos (HORTOBAGYI et al., 2016). Portanto, os estudos epidemiológicos em oncologia que incluem toda a população adulta, independente da faixa etária, tornam-se fundamentais para entender os desfechos clínicos e prognósticos de cada grupo populacional.

2.2 EPIGENÉTICA - AS SIRTUÍNAS

A epigenética pode ser definida como as alterações fenotípicas que ocorrem na estrutura do DNA e da cromatina sem alterar a sequência de nucleotídeos. Os mecanismos epigenéticos são importantes na regulação da estrutura genômica e por isso pode modular a expressão do gene (LOCKE, CLARK, 2012). Na carcinogênese várias são as alterações que podem ocasionar instabilidade no genoma e, dentre estas, estão as alterações epigenéticas que podem estar envolvidas, também, em processos de heterogeneidade tumoral (TAN, MOK, REBBECK, 2016).

A expressão gênica é controlada por vários mecanismos e a metilação do DNA e a modificação das histonas são essenciais no processo de regulação da transcrição gênica (JENUWEIN, ALLIS, 2001; BYLER et al., 2014). Nos núcleos de todas as células eucarióticas localiza-se a estrutura genômica do DNA, *ácido desoxirribonucleico*, que está dobrado, restringido e compactado por histonas e proteínas não histonas formando um polímero chamado de cromatina. A cromatina se organiza em diferentes níveis e sua estruturação depende dos nucleossomos que representam a unidade básica da cromatina. O nucleossomo é formado pela dupla hélice de DNA envolto em um octâmero de histonas - H2A, H2B, H3 e H4. As Histonas são pequenas proteínas básicas formadas por um domínio globular, um domínio flexível e uma cauda terminal NH₂ (histona de cauda) (JENUWEIN, ALLIS, 2001).

As histonas desempenham um importante papel na regulação da estrutura da cromatina. As modificações nas histonas, têm sido muito estudadas, e postula-se a existência do “código das histonas”, referindo-se a um estado de “memória biológica” em que as alterações genéticas ou epigenéticas são reconhecidas e podem ser mantidas as alterações nas histonas ativando ou inibindo vias de sinalização importantes para a proliferação e diferenciação celular e para o silenciamento dos genes (JENUWEIN, ALLIS, 2001). Dentre os mecanismos de modificação das histonas, os processos mais estudados são, a fosforilação, a acetilação, reações catalisadas por histonas acetil transferases, e a reação inversa, a desacetilação, que são realizadas por histonas desacetilases (DALI-YOUCHEF et al., 2007; BYLER et al., 2014). As histonas desacetilases (HDACS) são divididas em três classes, as histonas da classe I, são geralmente nucleares e se associam com repressores da transcrição gênica e co-fatores, as histonas da classe II são proteínas maiores e de transporte entre o citoplasma e o núcleo, as histonas da classe III ou sirtuínas são proteínas que exigem como substrato um co-fator, a nicotinamida adenina, e as histonas da classe IV, são compostas apenas pela HDACS 11 (JOHNSTONE, LICHT, 2003; DELCUVE et al., 2012). As Histonas das classes I, II e IV necessitam do Zinco (Zn^{2+}), como co-fator para suas reações enzimáticas (DELCUVE et al., 2012).

A acetilação do grupo amina do aminoácido lisina foi descoberto pela primeira vez nas histonas e, é uma modificação pós-tradução dinâmica regulado pelas atividades opostas das lisinas acetiltransferases (KATs) e das histonas desacetilases (HDACs). A acetilação das histonas modula a estrutura da cromatina que está envolvida na replicação do DNA, reparo do DNA, silenciamento da heterocromatina e a transcrição de genes. Já, a hiperacetilação atua, geralmente, em genes transcritos ativos, uma vez que contribui para o estado de descondensação da cromatina e mantém a estrutura desdobrada do nucleossomo transcrito. As histonas desacetilases (HDACs) são encontradas em complexos de genes co-repressores e, por remoção de grupos acetilo, induzem a formação de uma estrutura de cromatina compactada e transcricionalmente reprimida. Desta forma, as HDACs atuam na regulação da transcrição gênica.

As Sirtuínas são proteínas, histonas desacetilases da classe III, que catalisam a remoção de grupos acetila, levando à condensação da cromatina e repressão

transcricional, mantendo a regulação da expressão gênica (DALI-YOUCHEF et al., 2007; PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015). As sirtuínas, dos mamíferos, são uma família de moléculas altamente conservadas com domínio catalítico e dependentes da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Foram identificadas sete sirtuínas, de acordo com sua localização e funções metabólicas, sendo que as SIRT-1, SIRT-6 e SIRT-7 localizam-se predominantemente no núcleo celular, a SIRT-2 no citosol citoplasmático e, as SIRT-3, SIRT-4 e SIRT-5 localizam-se em compartimentos mitocondriais (HALL et al., 2013).

Estas moléculas estão relacionadas com a regulação do processo de silenciamento celular e implicados em diversos mecanismos vitais da célula, como apoptose, inflamação, diferenciação e crescimento, envelhecimento, angiogênese, reparo do DNA, stress e balanço energético (ASHRAF et al., 2006; PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011). A alteração na expressão das sirtuínas provoca perda da regulação epigenética, podendo estar relacionada a etiologia e patogenia de diversos processos inflamatórios crônicos nos sistemas cardiovascular, neurológico e articular (HAIGIS, GUARENTE, 2006; HARJES, BENSAD, HARRIS, 2012; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015). Além disto, a alteração na expressão das sirtuínas, têm sido implicados em diversos mecanismos de iniciação e proliferação celulares na carcinogênese humana (LIM, 2007; MOORE, DAI, FALLER, 2012).

As sirtuínas atuam como enzimas importantes para auxiliar as células em mecanismos de defesa contra agentes estressores crônicos do meio interno ou externo (DALI-YOUCHEF et al., 2007). Desta forma, a alteração na expressão das sirtuínas podem ocasionar fragilidade nos mecanismos de defesas celulares e, conseqüentemente, precipitar o aparecimento de doenças relacionadas ao envelhecimento como, as doenças neurodegenerativas e o câncer (LOCKE, CLARK, 2012; HALL et al., 2013).

Os inibidores das HDACs, dependentes do Zn²⁺, foram originalmente descobertos como indutores, da inibição do crescimento de células proliferadas e da morte celular, porém só mais tarde, foram identificados como inibidores da atividade das HDACs (DELCUVE et al., 2012). A especificidade dos inibidores das HDACs, em relação a células tumorais, embora pouco compreendida, levou ao seu desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos (ZARDAVAS, BASELGA,

PICCART, 2013). Mais recentemente, estudos clínicos usando os inibidores de HDAC foram estendidos para uma variedade de doenças não tumorais, tais como anemia de células falciformes, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a fibrose cística, a distrofia muscular, doenças neurodegenerativas e desordens inflamatórias inespecíficas (DELCUVE et al., 2012). Assim, os estudos com inibidores de HDAC são emergentes na literatura, e os principais mecanismos propostos nas diferentes etapas da oncogênese, estão descritas no Quadro 1 (JOHNSTONE, LICHT, 2003; WILTING, DANNENBERG, 2012).

Inibição da proliferação celular
Aumento do receptor nuclear responsável pela diferenciação celular Reversão da repressão por fusão de fatores de transcrição ou hiperexpressão de repressores Indução de p21 e diferenciação celular Reativação do silenciamento de genes de supressão tumoral em combinação com a inibição da metilação do DNA transferase Supressão do gene da expressão da telomerase
Indução de apoptose
Ativação da apoptose Ativação e /ou sensibilização da disfunção mitótica Segregação cromossômica aberrante e dano ao DNA Indução da topoisomerase II após sensibilização por agentes tóxicos ao DNA
Outros mecanismos
Alteração da sinalização angiogênica Alteração da função dos microtúbulos Indução de Antígenos MHC de superfície celular para aumentar a resposta imune Supressão de gene mediador da Interleucina-2

Quadro 1 - Inibição da descacetilação das histonas: mecanismos de ação na terapia do câncer

Fonte: Johnstone, Licht. (2003)

Alguns fármacos, alvos para inibição das HDACS, foram desenvolvidos e já estão em testes clínicos. O vorinostat®, está em fase II, registro NCT01118975, avaliado para segurança e eficácia em combinação com lapatinib, no câncer de mama HER-2 + metastático. O entinostat®, está em fase II, registro NCT01349959, avaliado para eficácia em combinação com 5-azacitidina, para câncer de mama metastático triplo negativo, fase II, registro NCT00676663, avaliado para segurança e eficácia em combinação com examestano, em câncer de mama metastático Luminal B Her-2 +. O Panobinostat®, está em fase I e II, registro NCT01194908, avaliado para eficácia em combinação com decitabina e tamoxifeno, para câncer de mama triplo negativo, localmente avançado ou metastático (ZARDAVAS, BASELGA, PICCART, 2013).

2.2.1 A Sirtuína-1 (SIRT-1)

A Sirtuína-1 (SIRT-1) é a principal molécula descrita da família das sirtuínas (BLANDER, GUARENTE, 2012; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015). A SIRT-1 têm sido associada com o silenciamento dos genes, o controle do ciclo celular, a apoptose, a homeostase de energia, e o envelhecimento (HWANG et al., 2014). Ela atua em diversos processos biológicos celulares vitais para a expressão gênica e, conseqüentemente, a sua hiperexpressão pode estar relacionada com o comportamento biológico do câncer de mama por desestabilização da regulação dos receptores de estrogênio ou através de outros substratos como p53 (ELANGOVAN et al., 2011).

A sirtuína-1 (SIRT-1) têm sido relacionada aos processos carcinogênicos de forma ambígua, sendo relatados atuações na supressão tumoral e ações na promoção da proliferação celular neoplásica (PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015).

A Figura 5 demonstra essas associações.

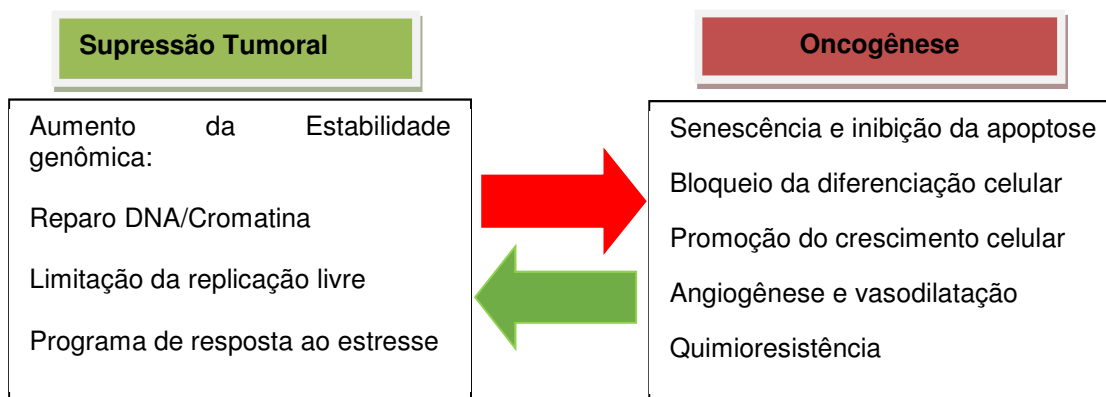


Figura 5 - Papel da SIRT-1 na Oncogênese celular.

Fonte: Adaptado, Presegué-Bosch, Vaquero (2011); Mellini, Valente, Mai (2015).

A sirtuína-1 (SIRT-1), além de desacetilar histonas, silenciando deste modo a transcrição do gene, tem atuações na desacetilação de muitas proteínas não-histonas, incluindo muitas enzimas de reparo do DNA, como a DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e o gene supressor de tumor p53. Tais evidências demonstram efetiva atuação na expressão gênica (HWANG et al., 2014). No câncer de mama, a SIRT-1 e SIRT-2 demonstraram uma possível regulação da aromatase, uma enzima que vem sendo inibida como estratégia terapêutica no câncer de mama, que expressa

receptores hormonais (KIMBERLY et al., 2013). Algumas evidências demonstram que a inibição da SIRT-1 em tumores resistentes a terapia hormonal poderia ser uma opção terapêutica para as pacientes com resistência hormonal (MOORE, DAI, FALLER, 2012).

Os estudos pré-clínicos, com a identificação de novas moléculas, têm sido fundamentais para estabelecer novos caminhos para a compreensão das vias de sinalização intracelular das células tumorais no câncer de mama (MOORE, DAI, FALLER, 2012). Desta forma, novos agentes medicamentosos, alvo moleculares mais seletivos, inibidores da SIRT-1, poderiam ser utilizados, isolados ou em combinação com outros fármacos, no tratamento do câncer de mama (ZARDAVAS, BASELGA, PICCART, 2013; HWANG et al., 2014). A inibição da SIRT-1 poderia bloquear a proliferação celular e induzir a apoptose nas células tumorais (HALL et al., 2013).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a regulação da expressão da SIRT-1 e a sua relação com o câncer ainda são desconhecidas, porém suas interações e de outras sirtuínas, com fatores relevantes para o câncer, são inegáveis (Figura 6). As razões para a hiperexpressão da SIRT-1, também são desconhecidas, e se esta expressão, realmente causa tumorigênese ou se é, simplesmente, uma consequência do mesmo ainda não foi esclarecido (PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011).

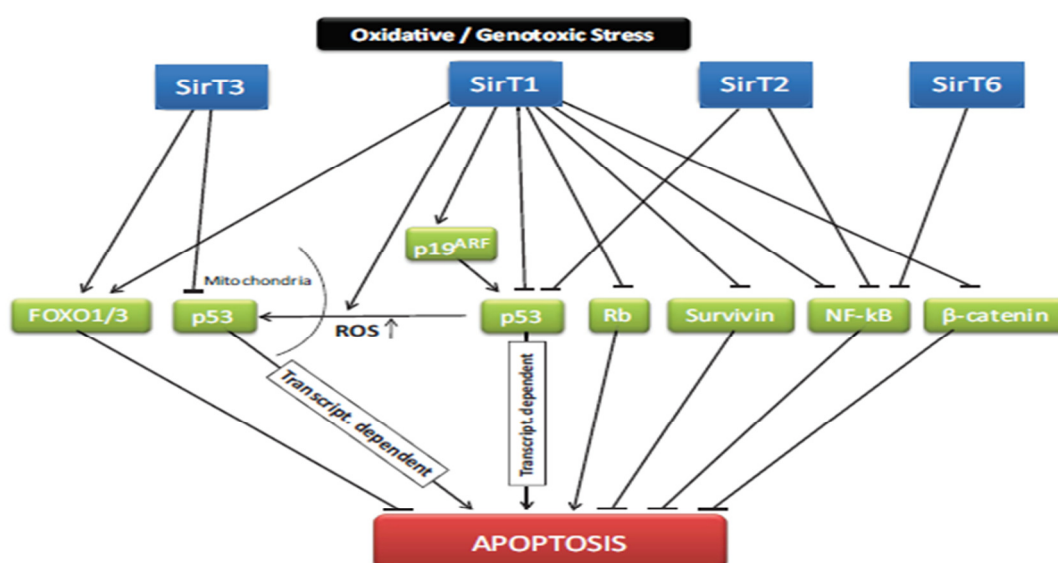


Figura 6 - Sirtuínas e sobrevivência celular.
Fonte: Presegué-Bosch, Vaquero (2011)

Assim, são fundamentais as pesquisas em diferentes grupos populacionais com a finalidade de identificar novos marcadores biomoleculares, prognósticos ou preditivos, como a SIRT-1, que, isoladamente ou em combinação aos já existentes, possam contribuir para melhorar as estratégias de tratamento do câncer de mama (HWANG et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMAS DA PESQUISA

As diversas formas de apresentação do câncer de mama, quanto aos seus aspectos clínicos, morfológicos, imuno-histoquímicos e moleculares, conferem assinaturas gênicas próprias à doença e, conseqüentemente, diferentes prognósticos e respostas terapêuticas anti-tumorais são obtidos.

Neste cenário, são fundamentais os estudos epidemiológicos regionais que avaliam os fatores preditivos e prognósticos clássicos e o impacto de “novos” fatores moleculares (biomarcadores), independentes ou em associação, que possam, desta forma, contribuir para a compreensão da oncogênese e proporcionar benefícios no amplo manejo clínico e terapêutico das pacientes portadoras de câncer de mama.

Dentro deste contexto, podemos levantar os seguintes problemas de pesquisa:

Existe hiperexpressão da sirtuína-1 (SIRT-1) em tecido mamário neoplásico?

Quais são os efeitos das alterações na expressão da sirtuína-1 (SIRT-1) e suas associações com a idade e outros marcadores prognósticos clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos na sobrevida do câncer de mama?

Há evidências que a expressão da sirtuína-1 (SIRT-1) possa ser um marcador prognóstico de maior agressividade biológica e, conseqüentemente, relacionada com menor sobrevida e maior risco de morte?

Estes achados podem ter implicação na abordagem oncológica das pacientes com câncer de mama, desde a prevenção, diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença?

4 HIPÓTESES

Considerando as evidências na literatura, que relacionam o grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) com a oncogênese e proliferação do câncer de mama, formulamos as seguintes hipóteses para a pesquisa:

H0 – A hiperexpressão de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1), em tecido neoplásico, independente ou associada a outras variáveis clínicas, histopatológicas ou imuno-histoquímicas, não interfere no prognóstico de mulheres portadoras de câncer de mama.

H1 – A hiperexpressão da Sirtuína-1 (SIRT-1), em tecido neoplásico, independente ou associada a outras variáveis clínicas, histopatológicas ou imuno-histoquímicas piora o prognóstico de mulheres portadoras de câncer de mama.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) em biópsias de tecidos tumorais de mulheres com câncer de mama e o seu valor prognóstico, independente ou associado a variáveis clínicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas, na sobrevida global doença específica de uma coorte de mulheres portadoras de câncer de mama.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na coorte de pacientes portadoras de câncer de mama:

- Descrever o grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) em amostras de biópsias de tecidos tumorais.
- Descrever as características relacionadas a variáveis clínicas: idade, estadiamento de acordo com a classificação TNM (AJCC) e os tipos de tratamentos empregados.
- Descrever as variáveis prognósticas histopatológicas clássicas: tamanho do tumor, grau histológico e o envolvimento metastático dos linfonodos axilares.
- Descrever as variáveis prognósticas imuno-histoquímicas: expressão dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona), expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano (Her-2) e expressão do índice de proliferação celular (Ki-67).
- Verificar o efeito independente da expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) e, em associação com as demais variáveis prognósticas, no tempo de sobrevida global doença específica.

- Verificar o efeito das variáveis clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas no tempo de sobrevida doença global específica.
- Estimar a sobrevida global doença-específica em 5 e 10 anos.

6 MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO

Estudo de coorte retrospectiva.

6.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A amostra, com base em registros médicos hospitalares, foi composta por uma coorte de 457 pacientes femininas portadoras de câncer de mama, diagnosticadas pelo Laboratório de Anatomia Patológica (Laboratório Medicina Diagnóstica) de Erechim-RS e submetidas a tratamento oncológico, no período de 2003 a 2013, nas seguintes instituições de Erechim: Centro de Oncologia Clínica Erechim (COC), Fundação Hospitalar Santa Terezinha Erechim (FHSTE) e Hospital de Caridade Erechim (HCE). A partir da composição completa da coorte, foram selecionados 123 casos para pesquisa, em blocos de parafina, do grau de expressão tecidual da Sirtuína-1 (SIRT-1) através da técnica de imuno-histoquímica.

O período de recrutamento para composição da coorte foi o primeiro dia do ano de 2003 (data inicial de ingresso na coorte) e o dia 31 de dezembro de 2013 (data final de ingresso na coorte).

Para a pesquisa da Sirtuína-1 (SIRT-1) foram selecionados os primeiros 123 casos sucessivos que ingressaram na coorte, a partir do dia primeiro de janeiro de 2003.

As informações sobre a exposição inicial (data do diagnóstico anatomopatológico) e do desfecho (óbito) foram obtidas por meio da análise dos registros dos prontuários médico-hospitalares de cada paciente que ingressou na coorte. As demais variáveis de interesse pesquisadas também foram obtidas através

da análise dos registros dos prontuários médicos hospitalares e do Laboratório de Anatomia Patológica.

Os dados referentes à variável definida como Sirtuína-1 (SIRT-1) foram obtidos através da pesquisa do grau de expressão da SIRT-1, através da técnica de imuno-histoquímica, em tecido tumoral de biópsia das 123 pacientes portadoras de câncer de mama selecionadas na coorte. As pacientes selecionadas estavam com o material, referente às biópsias tumorais, armazenados em blocos de parafina no laboratório de Anatomia Patológica (Laboratório Medicina Diagnóstica).

A data final de seguimento das pacientes na coorte, para análise do desfecho (óbito), foi o dia 31 de julho de 2015. Nesta data, todas as pacientes que estavam vivas foram censuradas.

6.2.1 Descrição dos locais da pesquisa

A cidade de Erechim situa-se na região Alto-Uruguai ao Norte do Estado do Rio Grande do Sul com uma população estimada de 100.000 habitantes (IBGE, Censo 2010). É a cidade sede da 11ª Coordenadoria Regional de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, e referência para o atendimento de alta complexidade em oncologia do Sistema Único de Saúde (SUS) para toda região Alto Uruguai gaúcho composta por 32 municípios e uma população aproximada de 250.000 habitantes.

O Laboratório Medicina Diagnóstica é o laboratório de anatomia patológica de referência para diagnóstico histopatológico do câncer em Erechim-RS e para a Região do Alto Uruguai-RS. A unidade dispõe de um banco de dados com os registros dos pacientes que foram submetidos a procedimentos de biópsias e seus respectivos resultados das análises histopatológicas. No banco de dados do Laboratório foi possível encontrar as seguintes informações de cada paciente: o registro da data do diagnóstico, as fichas técnicas, os laudos histopatológicos e o local (Instituição Hospitalar) em que cada paciente realizou o procedimento da biópsia.

O Centro de Oncologia Clínica Erechim é uma clínica de tratamento oncológico para pacientes portadores de câncer que atua desde 1994 na cidade de Erechim-RS proporcionando tratamento de quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e

hormonioterapia antineoplásicos. A Clínica dispõe de um banco de dados com registro de todos os pacientes atendidos e um arquivo médico para armazenamento dos prontuários médicos.

A Fundação Hospitalar Santa Terezinha Erechim (FHSTE) é um Hospital público, também localizado na cidade, vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS). Tem abrangência regional sendo referência na área de alta complexidade em oncologia para uma população advinda da 11^a, 15^a e 19^a Coordenadorias Regionais de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, tendo iniciado as suas atividades na área de oncologia clínica em 1995 e em radioterapia no ano de 1999.

O Hospital de Caridade de Erechim (HCE) é uma instituição filantrópica fundada em 1930, de abrangência regional, que atende a diversas áreas da saúde caracterizando-se por ser hospital geral. Dispõe de uma unidade de internação clínica e cirúrgica específica para atendimento de pacientes oncológicos.

6.2.2 Cálculo amostral

a) Para a composição da Coorte Histórica:

Considerando as informações de estimativa de novos casos de câncer de mama para a região do Sul do Brasil, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o biênio 2012-2013, quando realizamos o projeto desta pesquisa, que estimou a ocorrência de 65 novos casos de câncer de mama feminino a cada 100 mil habitantes por ano (BRASIL, 2012) e uma população de 96.087 mulheres de Erechim-RS e região Alto Uruguai, do mesmo estado, (IBGE, Censo 2010), foi estimado para ingresso na coorte uma população de 360 mulheres.

b) Para investigação da Sirtuína-1 (SIRT-1) através da técnica de imunohistoquímica em blocos de parafina:

Através do programa estatístico, *Power and Sample Size Program v 3.0.14*, e assumindo um nível de significância de $\alpha=0,05$, poder estatístico de 80%, sobrevida mediana no grupo exposto (SIRT-1 positiva) de 45 meses, sobrevida mediana no grupo controle de 90 meses (SIRT-1 negativa), *hazard ratio* (HR) de 2,0 com 72 meses para recrutamento e 60 meses de seguimento após a inclusão da última

paciente, foi estimado a necessidade de investigação em 120 pacientes, para obtenção de significância estatística, de acordo com o desfecho proposto na pesquisa.

6.2.3 Critérios de inclusão

a) Para composição da Coorte Histórica:

Todas as pacientes femininas com diagnóstico de câncer de mama, codificados pelo CID C50 no Laboratório de Medicina Diagnóstica, confirmados através de biópsias histopatológicas e submetidas a tratamento oncológico nas instituições de Erechim: Centro de Oncologia Clínica Erechim (COC), Fundação Hospitalar Santa Terezinha Erechim (FHSTE) e Hospital de Caridade Erechim (HCE) no período de recrutamento da coorte, 2003 à 2013.

b) Para a investigação de Sirtuína-1 (SIRT-1) através da técnica de imunohistoquímica em blocos de parafina:

Foram selecionados os primeiros 123 casos registrados no Laboratório de Medicina Diagnóstica Erechim, a partir de 2003, que tinham blocos de parafinas que preencheram os critérios para realização da técnica. Além disto, apresentavam registros completos para aplicação do instrumento de coleta de dados.

6.2.4 Critérios de exclusão

a) Para composição da Coorte Histórica:

Homens com Câncer de Mama,

Pacientes que tinham registro no Laboratório, porém o prontuário médico não estava armazenado no Serviço de Arquivo Médico Hospitalar das Instituições em virtude do tratamento oncológico ter sido realizado fora da cidade de Erechim.

b) Para a investigação de Sirtuína-1 (SIRT-1) através da técnica de imunohistoquímica em blocos de parafina:

Pacientes que tinham registro no laboratório, porém o bloco de parafina referente ao diagnóstico histopatológico não encontrava-se armazenado no laboratório;

Pacientes que tinham registro e o bloco de parafina armazenados no laboratório, porém o bloco de parafina não apresentava condições para ser submetido à análise de acordo com os critérios para realização da técnica de imuno-histoquímica.

6.3 LOGÍSTICA DO ESTUDO

As atividades propostas na pesquisa foram desenvolvidas de acordo com as seguintes etapas:

a) Acesso ao banco de dados do Laboratório de Medicina Diagnóstica, em Erechim.RS, para selecionar todos os registros de pacientes cadastradas com o diagnóstico de carcinoma de mama, codificados com CID C50, no período de 2003 a 2013.

b) A partir dos registros selecionados, foram revisadas todas as fichas técnicas/laudos anatomopatológicos de pacientes com diagnóstico de câncer de mama. Aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

c) Foram obtidos os nomes das pacientes e os respectivos números de registros do prontuário médico para busca no Setor de Arquivos Médicos Hospitalares (SAME) das Instituições de Erechim: Centro de Oncologia Clínica Erechim (COC), Fundação Hospitalar Santa Terezinha Erechim (FHSTE) e Hospital de Caridade Erechim (HCE).

d) Foram realizados os procedimentos para a investigação da expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) através da técnica de imuno-histoquímica nos 123 blocos de parafina selecionados no Laboratório de Medicina Diagnóstica.

e) Com base nos registros dos prontuários médicos hospitalares, o instrumento elaborado para coleta de dados com as informações clínicas, anatomopatológicas e imuno-histoquímicas de interesse à pesquisa foi aplicado (APÊNDICE A). Os dados obtidos foram descritos e operacionalizadas às variáveis de interesse para criação de um banco de dados (QUADRO 2).

f) Para armazenamento das informações coletadas e adequação para a análise estatística foi criado um banco de dados em planilha *Excel*.

O desenho da pesquisa encontra-se esquematizado na Figura 7.

O pesquisador entrou em contato com o Responsável Técnico pelo Laboratório de Anatomia Patológica (Laboratório de Medicina Diagnóstica) a fim de informar os objetivos da pesquisa e solicitou autorização para a realização da mesma.

6.3.1 Descrição da técnica para realização da pesquisa de Sirtuína-1 (SIRT-1) nos blocos de parafina selecionados:

As etapas para realização da pesquisa da SIRT-1, através da técnica imuno-histoquímica, estão descritas a seguir:

– Fixação e obtenção de secções histológicas a partir do bloco de parafina com lâmina silanizada Dako, submetidas à técnica da imunoperoxidase, recuperação antigênica realizada em instrumento Dako, PT Link, com processamento três em um integrado, compreendendo a desparafinização, rehidratação e recuperação antigênica com tampões FLEX (DAKO) de baixo ou alto pH.

– Incubação com anticorpos primários por 20 minutos em temperatura ambiente.

– O anticorpo utilizado foi o *SIRT-1 human recombinant enzyme*.

– O kit de ensaio utilizado para a realização do exame imuno-histoquímico, através da reação de imunofluorescência, foi importado do laboratório Bioscience

(BPS). O kit é catalogado com a seguinte especificação: nº 50081 - Fluorogenic SIRT1 (Sirtuin1) - human recombinant enzyme.

– A amplificação foi realizada com sistemas EnVision FLEX (DAKO), com anticorpos secundários conjugados ao polímero EnVision e revelados com o sistema cromogênico DAB+líquido FLEX (DAKO).

– O Processamento foi realizado em plataforma automatizada Dako Autostainer Link 48.

– Os Controles positivos internos e externos atestaram a fidelidade das reações. As lâminas são montadas em Coversliper Dako, com meio de montagem e lamínulas Dako.

– Todos os reagentes e equipamentos tinham aprovação do FDA e ANVISA.

– Toda a operação dos equipamentos foi realizada por Biólogos treinados pela empresa Dako, e o treinamento realizado no Hospital AC Camargo/SP.

– Todos os casos foram analisados pelo médico patologista, chefe do Setor de Imuno-histoquímica do Laboratório de Medicina Diagnóstica, através da microscopia óptica com leitor de fluorescência.

– Após análise de cada caso, o médico patologista, registrou em planilha o resultado obtido da reação de imuno-histoquímica, seguindo os critérios adotados nesta pesquisa, para avaliação do grau de expressão da SIRT-1.

6.3.2 Locais e início das atividades

O início das atividades de coleta dos dados foi no mês de Janeiro de 2014, nos seguintes locais: ambulatório de oncologia do Centro de Oncologia Clínica de Erechim.RS; Serviço de Arquivo Médico (SAME) da Fundação Hospitalar Santa Terezinha de Erechim-RS e Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital de Caridade de Erechim-RS, onde estavam armazenados os prontuários médicos das pacientes incluídas na coorte.

A pesquisa da Sirtuína-1 (SIRT-1), através da técnica de imuno-histoquímica, foi realizada na sede do Laboratório de Medicina Diagnóstica, localizado na Rua

Pedro Álvares Cabral, número 37, na cidade de Erechim.RS tendo início no mês de agosto de 2015.

6.3.3 Desenho da pesquisa

A Figura 7, esquematiza o desenho da pesquisa.

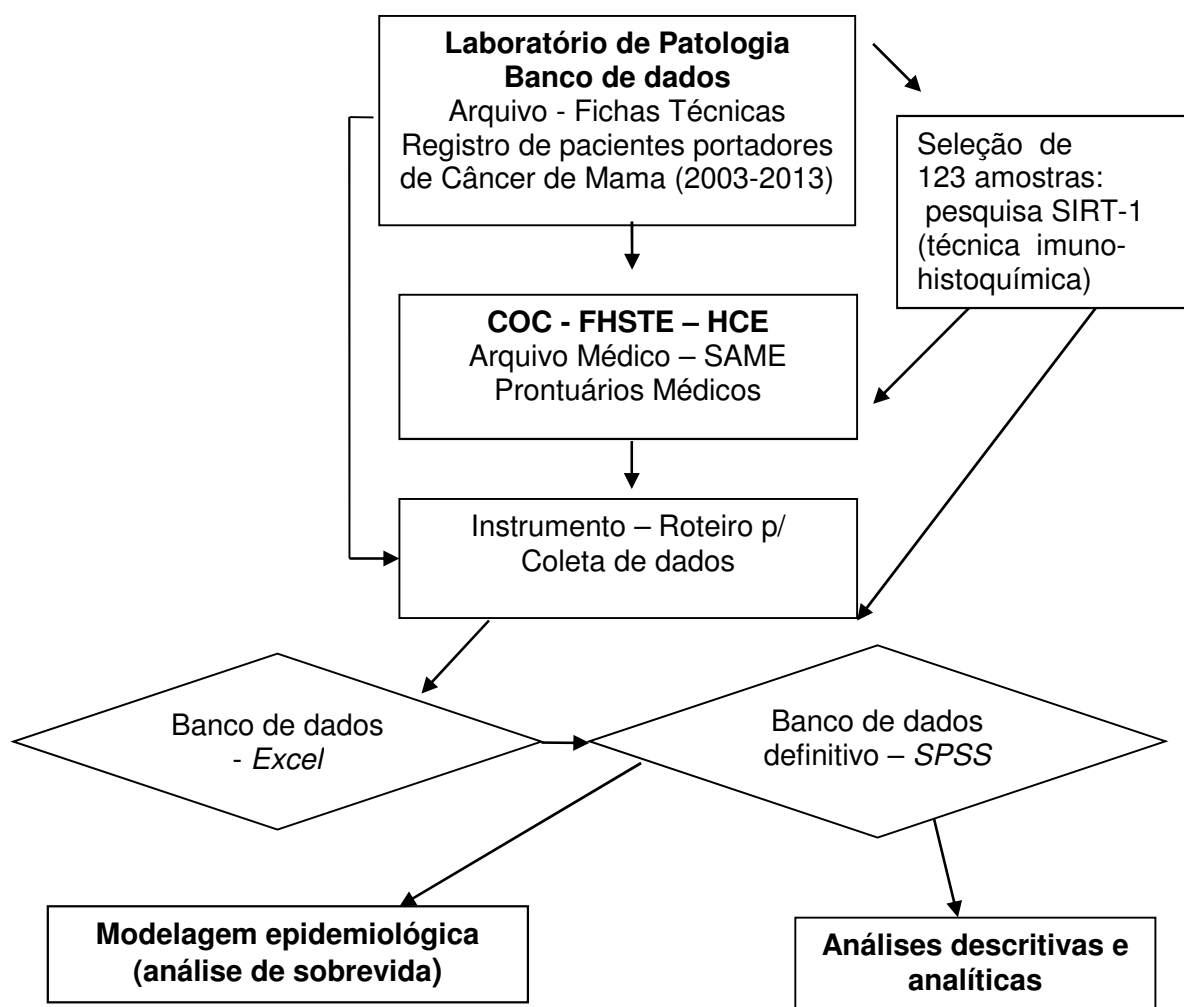


Figura 7 - Desenho Esquemático da Pesquisa
Fonte: O autor (2016)

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações pesquisadas e armazenadas no banco de dados serão analisadas através de estatística descritiva e analítica com base no modelo epidemiológico de análise de sobrevida proposto. O banco de dados será digitado

em planilha eletrônica *Microsoft Excel* e analisado pelo *Software estatístico SPSS – versão 21.0 for Windows*.

6.4.1 Banco de dados e descrição das variáveis

Para criação do banco de dados foi necessário descrever e realizar a operacionalização das variáveis de interesse pesquisadas no estudo. O Quadro 2, logo abaixo, apresenta o nome da variável, sua descrição e operacionalização no banco de dados.

Nome da variável (código)	Descrição	Operacionalização
NRLp (Número do registro Lab Patologia)	Variável de identificação da paciente no Laboratório de Patologia Medicina Diagnóstica.	Variável categórica obtida por números gerados pelo registro no Laboratório de Patologia
NRg (Número de registro geral)	Variável de identificação do paciente no registro hospitalar geral – SAME (COC ou FHSTE ou HCE).	Variável categórica obtida por números do registro hospitalar geral
AR (Ano de registro)	Ano de registro da paciente no Laboratório de Patologia.	Variável categórica obtida a partir do ano de registro da paciente no Laboratório de Patologia
DtN (Data de nascimento)	Data de nascimento da paciente	Variável tipo data pré-definida
I (Idade)	Idade da paciente no momento do primeiro atendimento e registro no Laboratório de Patologia.	Variável numérica calculada como: Idade = (data do registro do exame de anatomia patológica - data de nascimento)
DD (Data do diagnóstico)	Data do diagnóstico anatomo patológico registrada no laudo de exame médico.	Variável pré-definida de data
DPC (Data da 1ª consulta)	Data da 1ª consulta realizada e registrado no prontuário médico	Variável pré-definida de data
DIT (Data de início de tratamento)	Data de início do 1º tratamento oncológico realizado	Variável pré-definida de data
DUC (Data da última consulta realizada)	Data da última consulta realizada.	Variável pré-definida de data
V (Vivo)	Variável que define a condição de “estar vivo” na data de coleta dos dados	Variável categórica: 1. Sim 2. Não 3. Sem registro
DO (Data do óbito)	Data em que ocorreu o óbito do paciente – registro no prontuário.	Variável predefinida de data
CO (Causa do óbito)	Variável que indica a causa do óbito – registro no prontuário.	Variável categórica: 1. Relacionada ao câncer 2. Não relacionada ao câncer

Nome da variável (código)	Descrição	Operacionalização
EC (Estadiamento clínico)	Variável que define o grupo de estadiamento clínico da paciente na data do diagnóstico do câncer de mama – registro no prontuário de acordo com acordo com classificação TNM (AJCC).	Variável categórica: 1. Estágio I 2. Estágio II 3. Estágio III 4. Estágio IV
Dados do exame Anátomo-Patológico		
TH (Tipo histológico)	Tipo histológico descrito no exame anatomopatológico que confirma o diagnóstico.	Variável categórica: 1. Carcinoma ductal invasivo; 2. Carcinoma lobular invasivo; 3. Carcinoma mucinoso;
T (tamanho do tumor)	Variável que define o tamanho do tumor – registro no laudo do exame anatomopatológico	Variável categórica: 1. Tumor < 2 cm 2. Tumor 2 a 4,9 cm 3. Tumor > 5 cm 4. Tumor inflamatório
GH (grau histológico)	Variável que define o grau histológico tumoral – registro no laudo do exame anatomopatológico.	Variável categórica: 1. Baixo grau 2. Médio grau 3. Alto grau 4. Sem registro
Ln (status dos linfonodos axilares)	Variável que expressa o envolvimento metastático dos linfonodos axilares no diagnóstico - expresso no laudo anatomopatológico.	Variável categórica: 1. Sem metástases 2. Metástases em 1 a 3 Ln 3. Metástases em 4 ou mais Ln 4. Metástases em Ln fusionados
HER-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano Her-2)	Variável que indica a expressão imuno-histoquímica do Her-2	Variável categórica: 1. Her-2 : score 3+ 2. Her-2 : score 2+ 3. Her-2 : score 1+ 4. Her-2: score 0 5. Sem registro
RE (receptor de estrogênio)	Variável que indica a expressão imuno-histoquímica do receptor de estrogênio	Variável categórica: 1. Positivo 2. Negativo 3. Sem registro
RP (receptor de progesterona)	Variável que indica a expressão imuno-histoquímica do receptor de progesterona	Variável categórica: 1. positivo 2. negativo 3. Sem registro
KI67 (índice de proliferação celular)	Variável que indica o grau percentual da expressão imuno-histoquímica do índice de proliferação celular (Ki- 67)	Variável numérica:
CIR (tratamento cirúrgico empregado)	Variável que identifica o tipo de tratamento cirúrgico empregado.	Variável categórica: 1. Mastectomia radical + esv axilar 2. Setorectomia + esv axilar 3. Não realizado
QtX (quimioterapia)	Variável que expressa a realização ou não de quimioterapia anti-neoplásica	Variável categórica: 1. Sim 2. Não
Rtx (radioterapia)	Variável que expressa a realização ou não de radioterapia	Variável categórica: 1. Sim 2. Não

Nome da variável (código)	Descrição	Operacionalização
Mtx (presença ou não de metástase)	Variável que expressa a presença ou não de metástase no momento do diagnóstico	Variável categórica: 1. Sim 2. Não
Dados da Pesquisa de SIRT-1 por imuno-histoquímica		
SIRT-1 (Sirtuína-1)	Variável que indica a expressão imuno-histoquímica da SIRT-1	Variável categórica: 1. Expressão alta: escore 3+ 2. Expressão baixa: escores 1+ e 2+ 3. Sem Expressão: escore nulo
Grau SIRT-1 (Grau da expressão da Sirtuína-1)	Variável que indica o grau percentual de expressão imuno-histoquímica da SIRT-1	Variável numérica

Quadro 2 - Descrição esquemática das variáveis para o banco de dados

Fonte: O autor (2016)

6.4.2 Modelo epidemiológico – análise de sobrevida

Para a Análise de Sobrevida, foi proposto um modelo teórico epidemiológico a partir dos seguintes pressupostos:

- Os sujeitos (pacientes) observam diferentes experiências de tempo de evento (recidiva, metástases ou óbito) durante o curso de sua doença;
- É possível calcular uma função de risco expressa pela probabilidade de um sujeito (paciente) experimentar um evento (metástases ou óbito) em um intervalo de tempo, dado que o indivíduo tenha “sobrevivido” desde o início do intervalo. A função de risco é, usualmente, descrita como $h(t)$ (CARVALHO et al., 2005).
- A função de riscos pode ser expressa em termos da probabilidade de sobrevida $f(t)$, e a função de sobrevida $S(t)$, como $h(t)=f(t)/S(t)$. Esta função pode ser calculada como a proporção de indivíduos ou sujeitos que experimentam um evento em um intervalo por unidade de tempo, desde que eles sobreviveram ao começo do intervalo (CARVALHO et al., 2005).

Assim, nesta pesquisa, foram considerados os seguintes critérios para a análise da sobrevida:

- a) O início da observação ou exposição para cada paciente (t0) foi a data do diagnóstico de câncer de mama comprovado pelo exame anatomopatológico.
- b) A data limite para ingresso na coorte foi o último dia do ano de 2013 e o seguimento foi até 31 de julho de 2015.
- c) Para a análise do tempo de sobrevida global doença-específica, o desfecho considerado foi a data do óbito decorrente do câncer de mama ou relacionado diretamente ao tratamento.
- d) As pacientes que foram a óbito por outras causas que não o câncer de mama ou decorrente diretamente do tratamento foram censuradas na data do óbito.
- e) Todas as pacientes vivas até a data final do seguimento, que foi em 31 de julho de 2015, foram censuradas na data do último registro no prontuário médico.
- f) As pacientes perdidas durante o seguimento contribuíram para o cálculo da sobrevida até a última data registrada no prontuário médico.

Para estimar a probabilidade de sobrevida global doença específica foi utilizado, como tempo inicial, a data do diagnóstico de carcinoma de mama verificado no exame de anatomia patológica e, para o desfecho final, será a data do óbito por câncer, ou para as pacientes vivas, a data do última consulta médica registrada no prontuário médico.

6.4.3 Variáveis biológicas

As variáveis ou fatores prognósticos pesquisados foram os seguintes:

- idade no momento do diagnóstico;
- tipo histológico;
- grau histológico (nuclear): baixo, intermediário e alto;
- status dos linfonodos axilares: perfil do comprometimento metastático dos linfonodos axilares;

- receptores hormonais: expressão dos receptores de estrogênio e progesterona;
- índice de proliferação celular (ki-67): baixo e alto grau;
- receptor do fator de crescimento epidérmico humano (Her-2): grau de expressão;
- estadiamento TNM (AJCC): I a IV;
- tipo de tratamento empregado: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, tratamento alvo anti-Her-2 (Herceptin®)
- grau de Expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1).

6.4.4 Análise do grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1)

Todos os casos selecionados para investigação da expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1), através da técnica de imuno-histoquímica, obtiveram um grau de expressão tecidual de acordo com a análise do médico patologista.

O grau percentual de expressão da SIRT-1 foi determinado pelo médico patologista e registrado como uma variável numérica, de zero a 100%, de acordo com a reação imunofluorescente da SIRT-1 no núcleo das células tumorais por campo de microscopia óptica.

Para modelagem epidemiológica e análise estatística e de acordo com o desfecho de interesse, proposto nesta pesquisa, foram adotados os seguintes critérios de classificação das pacientes. De acordo com o grau de expressão da SIRT-1, obtidos na investigação, as pacientes foram classificadas em:

- **Expressão negativa(0)**: grau de expressão nuclear de SIRT-1 ausente ou em até 1% das células tumorais;
- **Expressão fraca (1+)**: grau de expressão nuclear de SIRT-1 entre 1 e 49% das células tumorais;
- **Expressão Moderada (2+)**: grau de expressão nuclear de SIRT-1 entre 50 e 79% das células tumorais;
- **Expressão Forte (3+)**: grau de expressão nuclear de SIRT-1 acima de 80% das células tumorais.

6.4.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando-se o programa estatístico *SPSS versão 21.0*.

Foi apresentada uma análise descritiva de todas as variáveis prognósticas ou preditivas pesquisadas em tabela com a discriminação dos seus estratos e as frequências encontradas.

Para estimar a probabilidade de sobrevida a cada tempo, foi utilizado o estimador de Kaplan-Meier e para a comparação entre as curvas, foi realizado o teste de *log-rank*. Com o objetivo de estimar os efeitos de cada variável na sobrevida das pacientes, foram criados modelos de risco proporcionais de Cox (MITCHELI, 2003).

As curvas de sobrevida foram decompostas em função das variáveis estudadas, análise univariada, e foram apresentados os riscos relativos (*Hazard Ratio-HR*) estimados. Os intervalos de confiança foram de 95%.

As variáveis que apresentaram significância estatística na análise univariada foram testadas num modelo multivariado, por meio do método de riscos proporcionais de Cox. Na análise multivariada final foram calculados os *Hazard Ratio (HR)* para cada modelo proposto para investigar as possíveis associações preditivas prognósticas de acordo com o objetivo do estudo (MITCHELI, 2003).

6.4.6 Metodologia da análise

O plano de análise da pesquisa, orientado pelo objetivo principal e os objetivos específicos do estudo, foi realizado de acordo com os critérios adotados pelos pesquisadores e apresentado na forma descritiva dos dados e na modelagem epidemiológica proposta para a tese.

6.5 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado após apreciação e aprovação pela Comissão Científica do IGG, em 24 de setembro de 2013 e, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, conforme parecer número 465.362, de 22 de novembro de 2013. O presente estudo utilizou um termo de confidencialidade dos dados obtidos (APÊNDICE B).

Os pesquisadores adotaram as recomendações éticas de pesquisa da Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (BRASIL, 2012).

7 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta pesquisa são provenientes do estudo de coorte composto por 457 casos de pacientes portadores de câncer de mama. Para a investigação da expressão da Sirtuína-1(SIRT-1) em tecido tumoral mamário, através da técnica de imuno-histoquímica, foram selecionados 123 casos. O fluxograma da pesquisa está esquematizado na Figura 8.

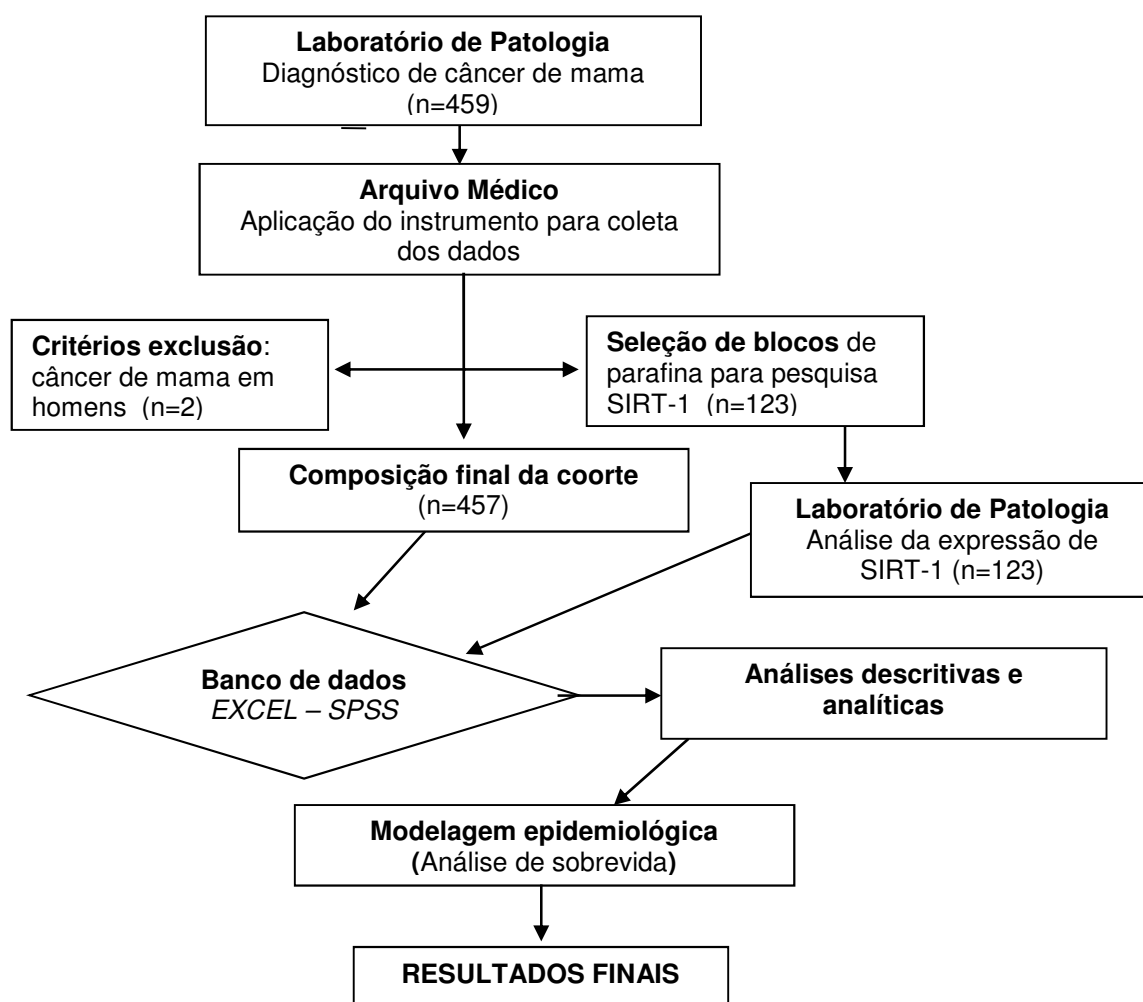


Figura 8 - Fluxograma da pesquisa para composição da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama e investigação das variáveis de interesse.

Fonte: O autor (2016).

O tempo mediano de seguimento da coorte, para análise do desfecho pesquisado, foi de 61,93 meses, sendo que o tempo mínimo de seguimento foi de 1,37 meses (42 dias) e o tempo máximo de seguimento foi de 153,03 meses (12,75 anos). O histograma do tempo em meses, de seguimento da coorte, está demonstrado na Figura 9.

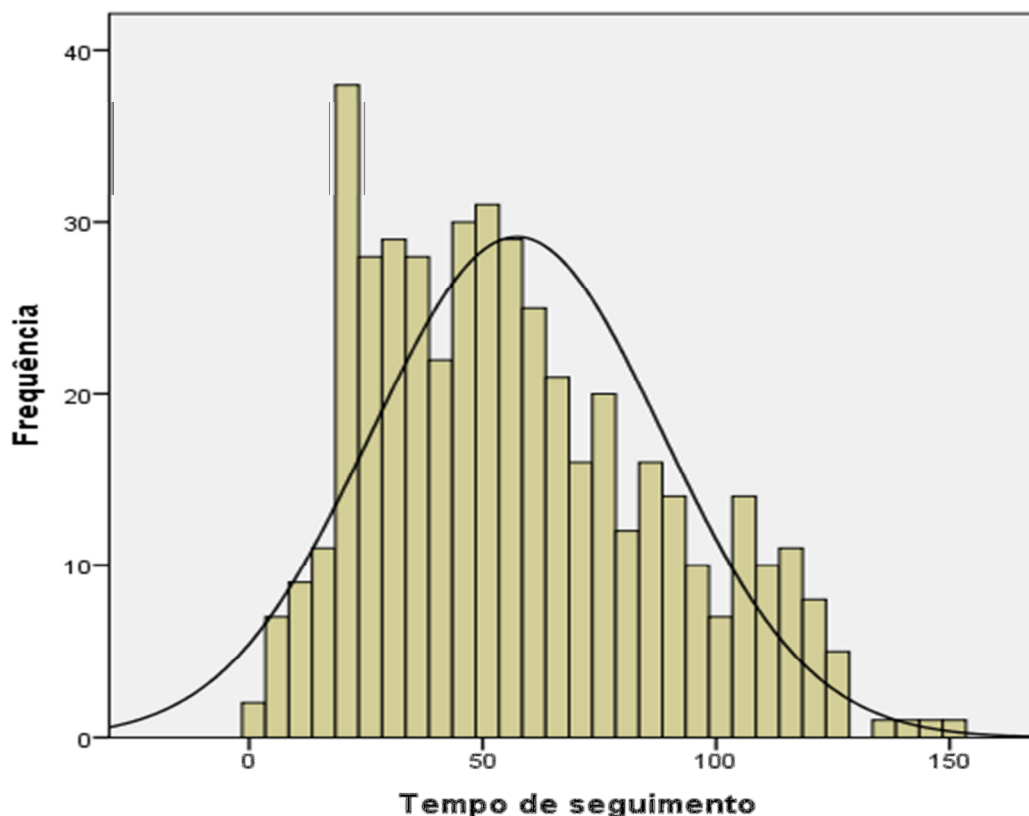


Figura 9 - Histograma do tempo de seguimento em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama.
Fonte: O autor (2016).

A Tabela 1, apresenta todas as variáveis pesquisadas com suas categorizações e as frequências relativas, no momento do ingresso na coorte, e o número de eventos ocorridos para cada variável e categorizações, durante o período de seguimento na coorte composta por pacientes portadoras de câncer de mama. A seguir serão descritos os resultados obtidos para cada variável pesquisada.

A idade mediana da população estudada foi de 57,48 (desvio padrão $\pm 27,76$ anos), sendo que a idade mínima foi de 25 anos e a máxima de 92 anos. O histograma de distribuição das idades da coorte está demonstrado na Figura 10. De acordo com a distribuição das pacientes nas faixas etárias categorizadas para o estudo, foram encontrados 149 pacientes (32,6%) com menos de 50 anos; 115

pacientes (25,2%) com idades entre 50 e 59 anos; 90 pacientes (19,7%) com idades entre 60 e 69 anos e 103 pacientes (22,5%) com idade igual ou superior a 70 anos.

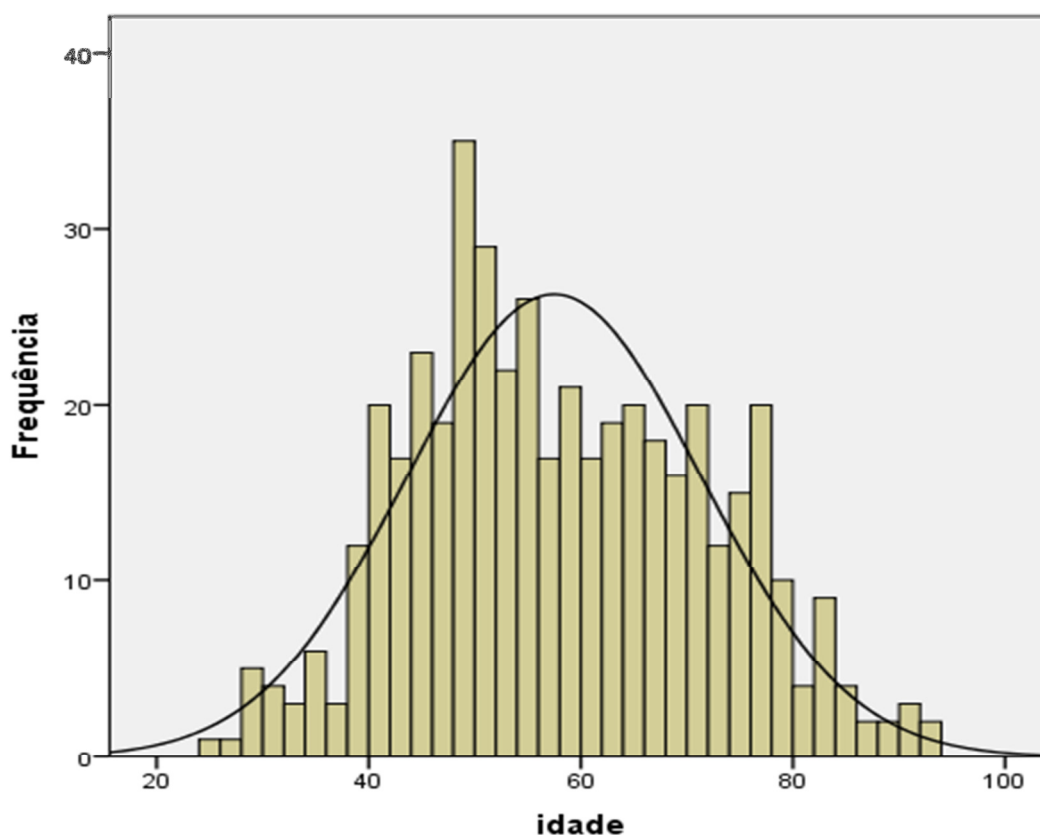


Figura 10 - Histograma da distribuição das idades em anos da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama

Fonte: O autor (2016).

De acordo com os registros dos tipos histológicos de câncer de mama, encontrados nas pacientes da coorte estudada, observamos um amplo predomínio do carcinoma ductal invasor em 396 pacientes (86,9); 48 pacientes (10,5%) com carcinoma lobular invasor e 12 pacientes (2,6%) com carcinoma mucinoso.

O tamanho do tumor da mama foi distribuído em intervalos de medidas de acordo com os critérios internacionais adotados pela classificação de tumores malignos, o TNM, do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) designados para o câncer de mama. Conforme os registros analisados, encontramos 131 pacientes (28,7%) com tumores T1 (< 2cm); 265 pacientes (58%) com tumores T2 (2 a 4,9cm); 34 pacientes (7,4%) com tumores T3 (\geq 5 cm) e 27 pacientes (5,9%) com tumores T4 (inflamatórios).

Conforme o envolvimento metastático dos linfonodos axilares avaliados, de acordo com os registros analisados, foram encontrados 225 pacientes (49,2%) sem

comprometimento metastático axilar (N0); 146 pacientes (31,9%) com comprometimento de até 4 linfonodos axilares (N1); 71 pacientes (15,6%) com comprometimento de 4 ou mais linfonodos axilares (N2); e 15 pacientes (3,3%) com linfonodos fusionados comprometidos(N3).

A presença de metástases sistêmicas foi investigada e observamos nos registros da coorte estudada que a ampla maioria dos casos, 452 pacientes (98,9%), não apresentavam metástases no momento do diagnóstico. De acordo com os registros, apenas 5 pacientes (1,1%) apresentavam metástases à distância.

O estadiamento tumoral, no momento do diagnóstico, foi agrupado de acordo com a Classificação de Tumores Malignos (TNM) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). O estadiamento TNM (AJCC) para câncer de mama, em síntese, é assim classificado: Estágio I, tumores menores a 2 cm de diâmetro máximo, axila negativa e sem metástases; Estágio II, tumores entre 2 e 4,9 cm, axila negativa e sem metástases, ou qualquer tamanho de tumor, axila positiva com até 3 linfonodos comprometidos, sem linfonodos fusionados e sem metástases; Estágio III, qualquer tamanho tumoral desde que a axila seja positiva com 4 ou mais linfonodos comprometidos ou fusionados, tumores inflamatórios, tumores maiores que 5 cm e axila positiva independente no número de linfonodos envolvidos, e sem metástases; e Estágio IV, qualquer tamanho do tumoral ou status axilar, tendo evidências de metástases sistêmicas. Assim, de acordo como os registros na coorte pesquisada, observamos 91 casos (19,9%) estágios I, 249 casos (54,5%) estágios II, 112 casos (24,5%) estágios III e 5 casos (1,1%) estágios IV.

O grau histológico tumoral é uma variável que expressa o grau de diferenciação das células tumorais determinado pelo Sistema de Classificação Nottingham (NGS). Os tumores com características bem diferenciadas são classificados em baixo grau, os tumores moderadamente diferenciados são classificados em grau intermediário e os tumores pouco diferenciados ou indiferenciados são classificados como alto grau. De acordo com a investigação na coorte estudada observamos a seguinte distribuição dos casos: 41 pacientes (9,0%) classificadas como grau histológico baixo, 301 pacientes (65,8%) classificadas como grau histológico intermediário e 115 pacientes (25,2%) classificadas como grau histológico alto. De acordo com os registros imuno-histoquímicos do perfil da expressão dos receptores de estrogênio (RE) na coorte

estudada, observamos 365 casos (79,9%) de expressão positiva para receptores de estrogênio (RE) e 92 casos (20,1%) com expressão negativa. Quanto ao perfil da expressão de receptores de progesterona (RP), observamos 339 casos (74,2%) de expressão positiva e de 118 casos (25,8%) de expressão negativa para receptores de progesterona (RP).

A investigação dos receptores hormonais (RH) foi realizada a partir das informações obtidas da expressão dos receptores de estrogênio e de progesterona. As pacientes foram classificadas em receptores hormonais (RH) positivas quando apresentaram expressão positiva para o receptor de estrogênio ou de progesterona; e foram classificadas em receptores hormonais (RH) negativas quando apresentaram ambos os receptores de estrogênio e progesterona negativos. A partir destes critérios, na coorte estudada, observamos que 81 pacientes (17,7%) foram classificadas em receptores hormonais (RH) negativas e 376 pacientes (82,3%) foram classificadas em receptores hormonais (RH) positivas.

Quanto aos registros da expressão tecidual por imuno-histoquímica do gene Her-2 (C-erb2), nos casos da coorte estudada, e considerando os critérios internacionais para categorização e análise da expressão tecidual do gene Her-2, identificamos que 90 casos (19,7%) apresentaram hiperexpressão do Her-2 e 367 casos (80,3%) apresentaram expressão negativa para o gene Her-2. Para análise da expressão do Her-2, foram adotados os seguintes critérios: os casos que apresentaram, por imuno-histoquímica, expressão forte (3+) foram classificados como Her-2 hiperexpressos; os casos que apresentaram expressão intermediária (2+) foram testados pelo método de *fluorescence in situ hybridization* (FISH) para confirmação ou não desta expressão; os casos com ausência de expressão (nulos), expressão intermediária (2+), após FISH, ou expressão fraca (1+) foram considerados Her-2 negativos.

Os índices de proliferação celular (Ki-67) são determinados por técnica de imuno-histoquímica e sua expressão registrada em percentual. Para determinar o grau de expressão do Ki-67 foram classificados: Ki-67 de baixo grau os casos que expressaram valores menores ou iguais a 14% e, Ki-67 de alto grau, os casos que expressaram valores maiores que 15%. Assim, de acordo com os registros, identificamos Ki-67, de baixo grau, em 132 pacientes (28,9%) e, Ki-67, de alto grau, em 325 pacientes, representado 71,1% dos casos.

A partir dos registros histopatológicos e imuno-histoquímicos da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama, foram agrupados os casos de acordo com a expressão dos marcadores biológicos, obtendo assim, o perfil molecular para cada caso. Os critérios adotados para classificar os marcadores e determinar o perfil molecular de cada paciente foram de acordo com os preconizados e recomendados pelo Consenso de St Gallen de 2015. Os critérios adotados para a classificação molecular foram os seguintes:

- Luminal A: expressão do receptor de estrógeno (RE) positivo, Her-2 negativo, índice de proliferação Ki-67 com grau menor que 15% e receptor de progesterona positivo com expressão maior que 20%;

- Luminal B Her-2 negativo: expressão do receptor de estrógeno (RE) positivo, Her-2 negativo, índice de proliferação Ki-67 com grau $\geq 15\%$ e receptor de progesterona negativo ou positivo com expressão menor que 20%;

- Luminal B Her-2 positivo: expressão do receptor de estrógeno (RE) positivo, Her-2 positivo, índice de proliferação celular Ki-67 com grau $\geq 15\%$ e receptor de progesterona negativo ou positivo com expressão menor que 20%;

- Her-2 hiperexpresso: expressão dos receptores de estrogênio e progesterona negativos, Her-2 positivo; e

- Triplo negativo: ausência de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e Her-2.

Assim, na coorte estudada, de acordo com os critérios acima descritos foram classificados 111 casos (24,3%) em perfil Luminal A; 216 casos (47,3%) classificados em perfil Luminal B Her-2 negativo; 64 casos (14%) classificados em perfil Luminal B Her-2 positivo; 26 casos (5,7%) classificados em perfil Her-2 hiperexpresso e 40 casos (8,8%) classificados em perfil Triplo negativo.

A partir dos registros nos prontuários médicos, pesquisamos os tipos de tratamentos oncológicos que foram realizados, nas pacientes portadoras de câncer de mama, logo após o diagnóstico. Foram investigados os seguintes procedimentos terapêuticos: cirurgia, quimioterapia anti-neoplásica, radioterapia, hormonioterapia anti-neoplásica e tratamento alvo anti-Her-2 com herceptin®.

Quanto ao procedimento cirúrgico realizado para as pacientes da coorte estudada, identificamos que 275 pacientes (60,2%) foram submetidos à cirurgia

radical (mastectomia), 181 pacientes (39,6%) foram submetidos à cirurgia conservadora e uma paciente (0,2%) não foi submetido a procedimento cirúrgico.

De acordo com os registros, a quimioterapia anti-neoplásica foi realizada em 340 pacientes (74,4%) e 117 casos (25,6%) não realizaram tratamento com quimioterapia. Quanto à realização de radioterapia, observamos que 289 pacientes (63,2%) realizaram o tratamento radioterápico e 168 pacientes (36,8%) não realizaram o tratamento. A hormonioterapia anti-neoplásica foi realizada em 368 pacientes (80,5%) e não foi realizada por 89 pacientes (19,5%). O tratamento alvo específico anti-Her-2 com Herceptin® é recomendado para pacientes com Hiperexpressão do receptor Her-2. Na coorte pesquisada identificamos 90 pacientes (19,7%) com hiperexpressão de Her-2, sendo que o tratamento anti-her-2 com herceptin® foi realizado em 49 pacientes (54,4%). O tratamento anti-her-2 com herceptin® não foi realizado em 41 pacientes (45,6%).

Tabela 1 - Descrição e frequência das variáveis pesquisadas no ingresso na coorte e eventos (mortes) ocorridos durante o tempo de seguimento das pacientes.

Variáveis	Total n=457	Eventos (mortes)	
		%	n=93
Faixa etária			
<50	149	32,6	21
50-59	115	25,2	16
60-69	90	19,7	21
≥70	103	22,5	35
Histologia			
Ductal invasor	396	86,9	79
Lobular invasor	48	10,5	13
Mucinoso	12	2,6	1
Tamanho do Tumor			
T1 (< 2 cm)	131	28,7	14
T2 (2 a 4,9 cm)	265	58,0	54
T3 (≥ 5 cm)	34	7,4	14
T4 (Inflamatório)	27	5,9	11
Linfonodos axilares			
N0 (negativos)	225	49,2	30
N1 (<4 linfonodos positivos)	146	31,9	35
N2(≥4 linfonodos positivos)	71	15,6	23
N3 (Linfonodos fusionados positivos)	15	3,3	5
Metástases			
Sem	452	98,9	88
Com	5	1,1	5

Variáveis	Total n=457	Eventos (mortes)		
		%	n=93	%
Estadiamento (TNM)				
I	91	19,9	5	5,5
II	249	54,5	50	20,1
III	112	24,5	38	32,5
IV	5	1,1	5	100
Grau Histológico				
Baixo	41	9,0	2	4,9
Intermediario	301	65,8	52	17,3
Alto	115	25,2	39	33,9
Receptor Estrogênio(RE)				
Negativo	92	20,1	26	28,3
Positivo	365	79,9	67	18,4
Receptor Progesterona(RP)				
Negativo	118	25,8	37	31,4
Positivo	339	74,2	56	16,5
HER-2				
Negativo	367	80,3	75	20,4
Hiperexpresso	90	19,7	18	20
Ki-67 (índice de proliferação)				
Baixo	132	28,9	21	15,9
Alto	325	71,1	72	22,2
Perfil Molecular				
Luminal A	111	24,3	18	16,2
Luminal B HER-2 negativo	216	47,3	41	19
Luminal B HER-2 positivo	64	14,0	11	17,2
HER-2 hiperexpresso	26	5,7	7	26,9
Triplo negativo	40	8,8	16	40
Cirurgia				
Conservadora	181	39,6	23	12,7
Radical	275	60,2	70	25,5
Não realizada	1	0,2	1	100
Quimioterapia				
Não realizada	117	25,6	23	19,7
Realizada	340	74,4	70	20,6
Radioterapia				
Não realizada	168	36,8	34	20,2
Realizada	289	63,2	59	20,4
Hormonioterapia				
Não realizada	89	19,5	26	29,2
Realizada	368	80,5	67	18,2
Herceptin® (alvo anti-Her-2)				
Não realizado	41	45,6	13	31,7
Realizado	49	54,4	5	10,2
Censuras				
Vivos	364	79,6		
Eventos				
Óbitos			93	20,4

Fonte: O autor (2016).

Para a análise do desfecho de interesse no estudo, no caso a ocorrência de mortes por câncer de mama, foi observado que ao final do tempo de seguimento proposto para a coorte estudada, 364 pacientes (79,6%) estavam vivas e foram censuradas em 31 de julho de 2015. Neste período de seguimento, 93 pacientes (20,4%) foram a óbito em decorrência do câncer de mama (Tabela 1).

A estimativa mediana de sobrevida global doença específica obtida ao final do estudo, pelo método de Kaplan-Meier, foi de 120,243 meses (10,02 anos) com desvio padrão de 2,928 (IC 95% 114,504 a 125,982) meses. As estimativas medianas de sobrevida calculadas para o desfecho morte, por câncer de mama, foram de 96,9% em 12 meses; 92,1% em 24 meses; 88,3% em 36 meses; 83,6% em 48 meses; 79,6% em 60 meses e 69,1% em 10 anos. A curva de sobrevida está demonstrada na Figura 11.

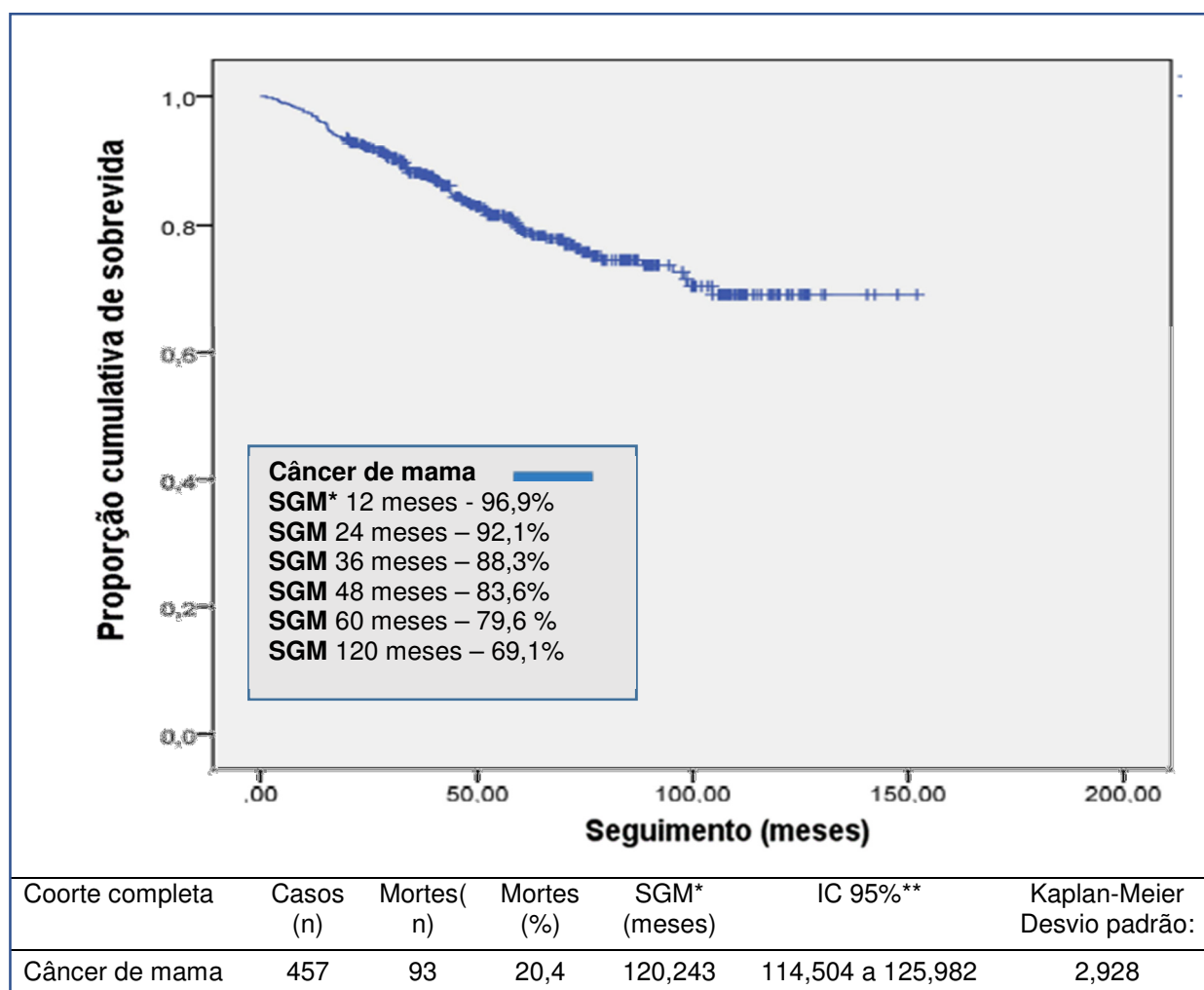


Figura 11 - Curva de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses das pacientes portadoras de câncer de mama durante o tempo de seguimento da coorte estudada.

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança

De acordo com os objetivos propostos na pesquisa, foram calculadas as estimativas de sobrevida global doença específica pelo método de Kaplan-Meier com testes de significância estatísticos especificados na metodologia da pesquisa. As curvas de estimativas de sobrevida (Kaplan-Meier) foram apresentadas em figuras de acordo com cada variável de interesse. Para avaliação da ocorrência do desfecho morte por câncer de mama, para cada variável pesquisada, foram calculados os *hazard Ratio* (HR) pelo método de Cox e apresentados com intervalos de confiança (IC) de 95% com o grau de significância estatística para cada análise. A Tabela 2 apresenta todas as variáveis prognósticas pesquisadas com os *hazard ratio* (HR) para a ocorrência do desfecho morte por câncer de mama, calculados pelo modelo univariado de Cox, para cada variável de interesse e suas categorias. Para cálculo do *harzad ratio* (HR) de cada variável pesquisada e categorizada, utilizamos o estrato inicial como base ou referência.

A Figura 12, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação à faixa etária das pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. As pacientes com idades inferior a 50 anos representaram 149 casos (32,6%) do total da amostra, tendo ocorrido 21 mortes neste grupo representando 14,9% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para esta faixa etária, foi de 121,074 meses (IC 95% 113,440 a 128,709). As pacientes com idades entre 50 e 59 anos representaram 115 pacientes (25,2%) do total da amostra, tendo ocorrido 16 mortes (13,9%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para esta faixa etária, foi de 109,792 meses (IC 95% 102,341 a 117,243). As pacientes com idades entre 60 e 69 anos representaram 90 pacientes (19,7%) do total da amostra, tendo ocorrido 21 mortes (23,3%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para esta faixa etária, foi de 109,784 meses (IC 95% 97,665 a 121,903). As pacientes com idade igual ou superior a 70 anos representaram 103 pacientes (22,5%) do total da amostra, tendo ocorrido 35 mortes (34%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica estimada, para esta faixa etária, foi de 98,721 meses (IC 95% 84,878 a 112,564). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de sobrevida ($X^2:21,896$; $p=0,000$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com a faixa etária, demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria da variável idade, tendo como referência a faixa etária menor que 50 anos (HR=1; $p=0,000$). As pacientes com faixa etária de 50 a 59 anos apresentaram HR de 1,03 (IC 95% 0,54-1,96; $p=0,942$); as pacientes com faixa etária de 60 a 69 anos apresentaram HR de 1,88 (IC 95% 1,02-3,44; $p=0,042$) e as pacientes com faixa etária ≥ 70 anos apresentaram HR de 2,92 (IC 95% 1,70-5,01; $p=0,000$) (Tabela 2).

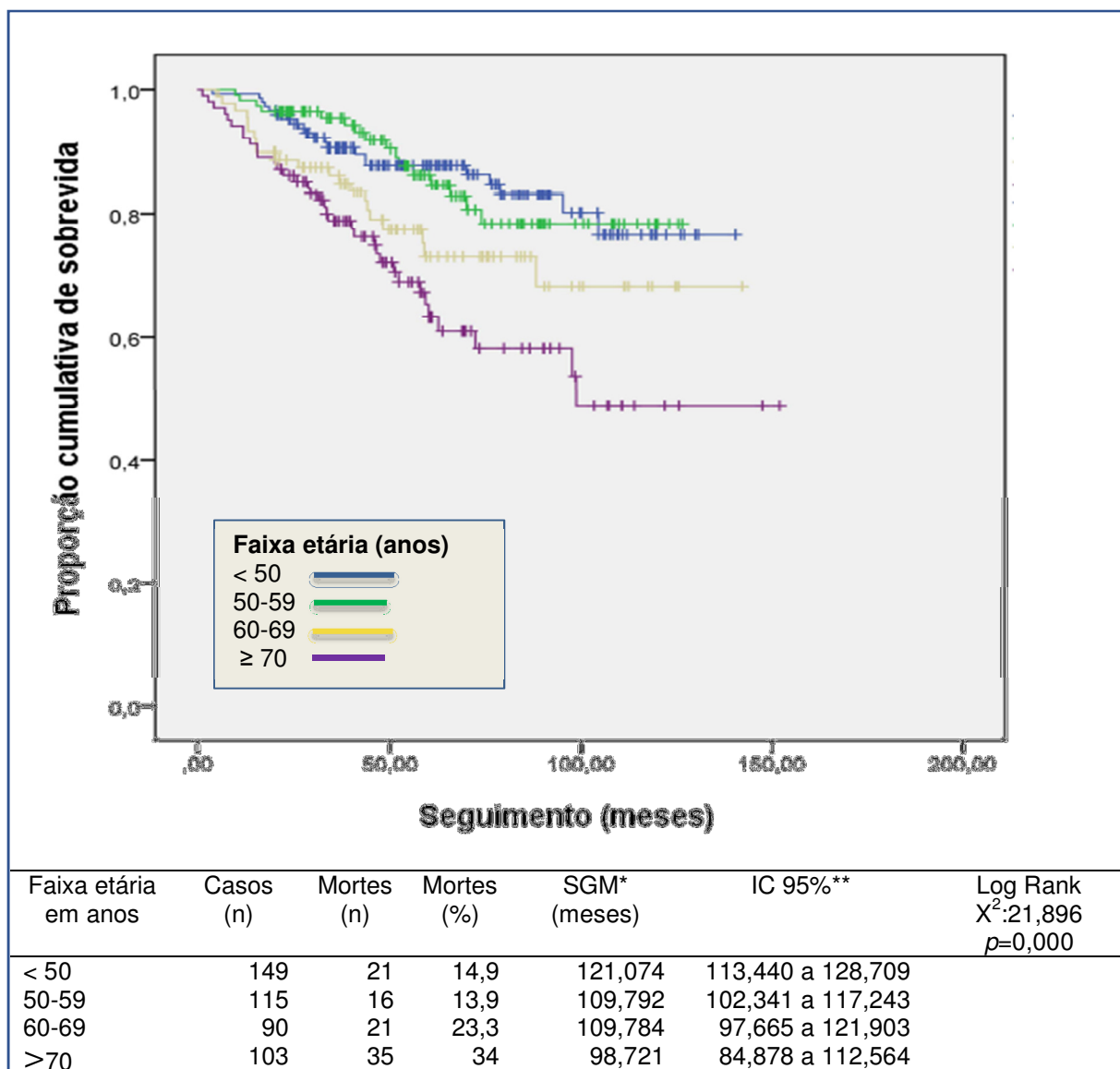


Figura 12 - Curvas de sobrevivência global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama estratificadas de acordo com a faixa etária

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevivência mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 13, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação aos tipos histológicos de câncer de mama encontrados nas pacientes da coorte estudada. O tipo histológico carcinoma ducal invasor (CDI) foi identificado em 396 pacientes (86,9%) do total da amostra, tendo ocorrido 79 mortes neste grupo representando 19,9% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a histologia carcinoma ductal invasor, foi de 121,007 meses (IC 95% 114,870 a 127,143). O tipo histológico carcinoma lobular foi identificado em 48 pacientes (10,5%) do total da amostra, tendo ocorrido 13 mortes (27,1%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica estimada, para as pacientes com a histologia carcinoma lobular, foi de 101,475 meses (IC 95% 83,872 a 119,077). O tipo histológico carcinoma mucinoso foi identificado em 12 pacientes (2,6%) do total da amostra, tendo ocorrido um óbito (8,3%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a histologia carcinoma mucinoso, foi de 136,492 meses (IC 95% 115,771 a 157,212). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as três curvas de distribuições de sobrevida ($X^2:3,194$; $p=0,203$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o tipo histológico de câncer de mama demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria da histologia, tendo como referência a histologia carcinoma ductal invasor (HR=1; $p=0,177$). As pacientes com histologia carcinoma lobular apresentaram HR de 1,48 (IC 95% 0,83-2,66; $p=0,199$) e, as pacientes com histologia carcinoma mucinoso, apresentaram HR de 0,34 (IC 95% 0,05-2,43; $p=0,280$) (Tabela 2).

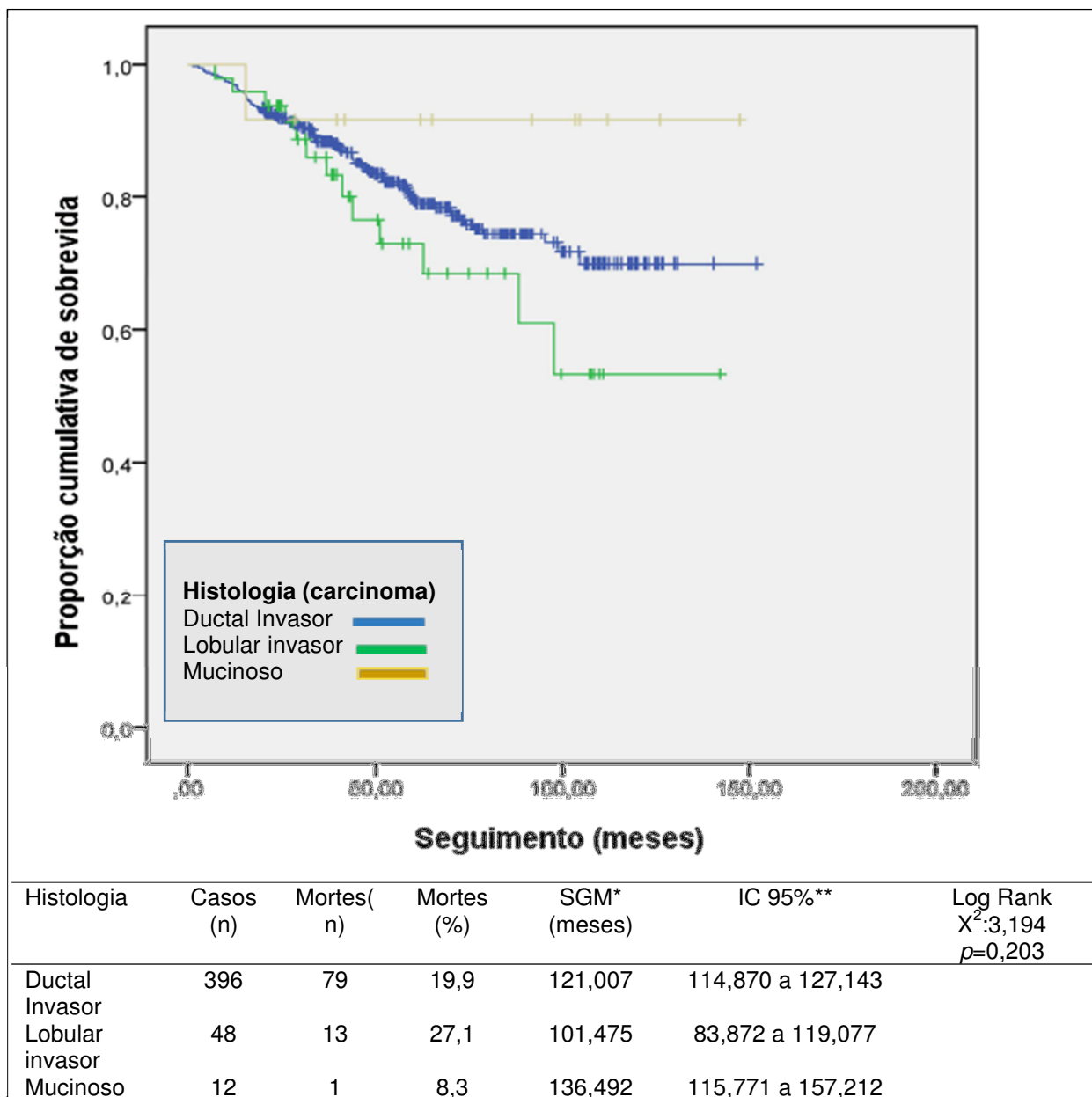


Figura 13 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a Histologia

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 14, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao tamanho do tumor das pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. A categorização para definir os intervalos de tamanho do tumor foram realizadas de acordo com os critérios internacionais da classificação TNM (AJCC). As pacientes com tumor menor que 2 cm, classificados como T1, representaram 131 casos (28,7%) do total da amostra, tendo ocorrido 14 mortes neste grupo, representando 10,7% dos casos. A mediana da sobrevida global

doença específica, estimada para pacientes com tumores classificados como T1, foi de 111,396 meses (IC 95% 103,582 a 119,270). As pacientes com tumores entre 2 e 4,9 cm, classificados como T2, representaram 265 pacientes (58,0%) do total da amostra, tendo ocorrido 54 mortes (20,4%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes com tumores classificados como T2, foi de 120,917 meses (IC 95% 113,637 a 128,197). As pacientes com tumores \geq 5 cm, classificados como T3, representaram 34 pacientes (20,5%) do total da amostra, tendo ocorrido 14 mortes (41,2%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes com tumores classificados como T3, foi de 80.904 meses (IC 95% 65,195 a 96,614). As pacientes com tumores inflamatórios, classificados como T4, representaram 27 pacientes (5,9%) do total da amostra, tendo ocorrido 11 mortes (40,7%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes com tumores classificados como T4, foi de 91,154 meses (IC 95% 65,918 a 116,380). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as quatro curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 24,689; $p=0,000$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o tamanho tumoral (T), segundo a classificação TNM, demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria do tamanho do tumor (T), tendo como referência os tumores T1(<2cm) (HR=1; $p=0,000$). As pacientes classificadas com tumores T2 (2 a 4,9cm), apresentaram HR de 1,86 (IC 95% 1,04-3,36; $p=0,038$); as pacientes classificadas com tumores T3 (\geq 5cm), apresentaram HR de 3,84 (IC 95% 1,83-8,08; $p=0,000$) e as pacientes classificadas com tumores T4 (inflamatórios) apresentaram HR de 5,12 (IC 95% 2,32-11,29; $p=0,000$) (Tabela 2).

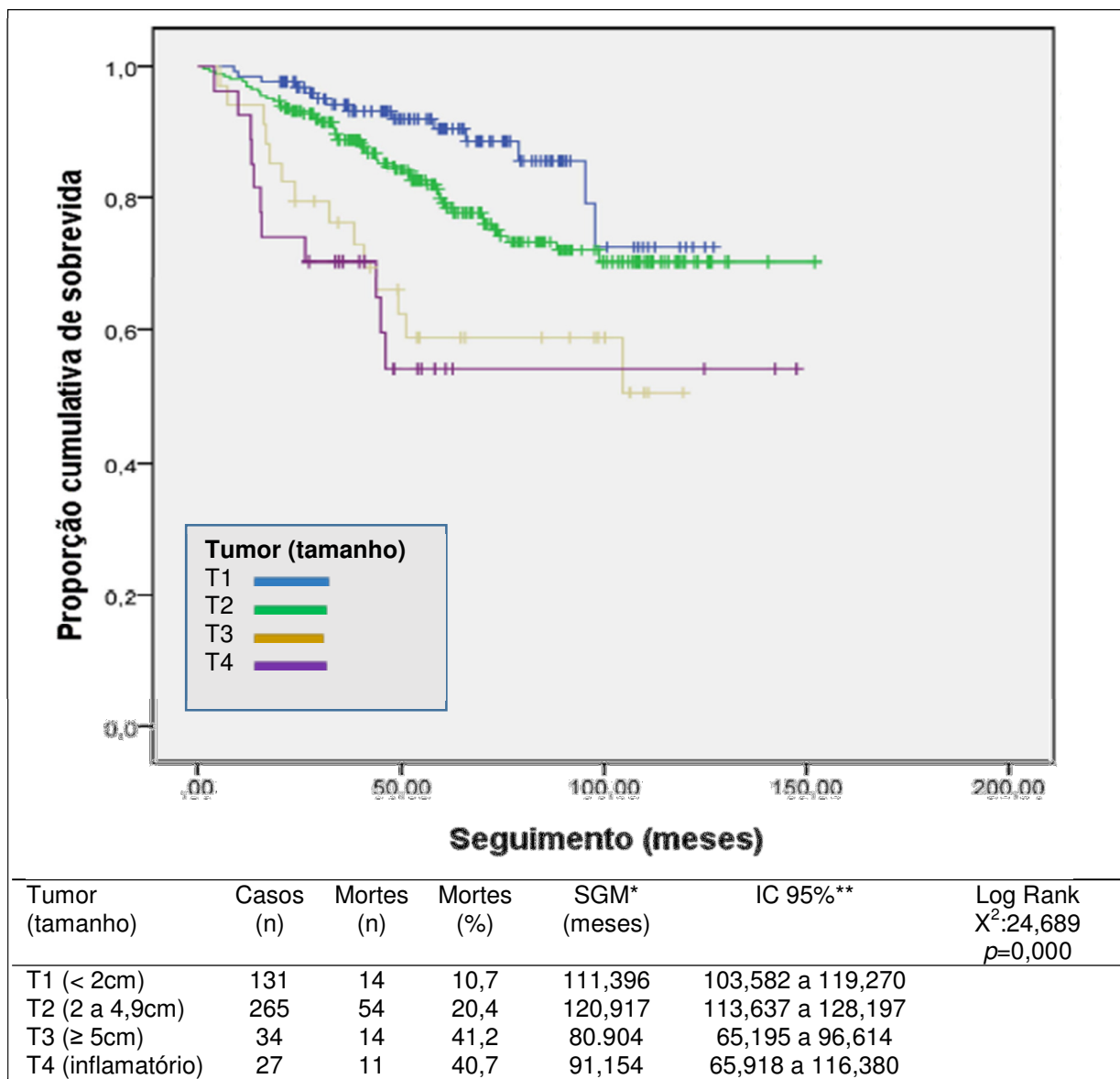


Figura 14 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama segundo tamanho do tumor

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 15, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao envolvimento metastático dos linfonodos axilares das pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. A categorização da variável que expressa o comprometimento dos linfonodos axilares foi realizada de acordo com os critérios internacionais da classificação patológica TNM (AJCC). As pacientes sem envolvimento metastático axilar, classificadas como N0 (TNM), representaram 225 casos (49,2%) do total da amostra, tendo ocorrido 30 mortes neste grupo, representando 13,3% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica,

estimada para pacientes sem comprometimento axilar, classificadas como N0 (TNM), foi de 123,164 meses (IC 95% 116,810 a 129,519). As pacientes com envolvimento metastático axilar de até 4 (quatro) linfonodos, classificadas como N1 (TNM), representaram 146 pacientes (31,9%) do total da amostra, tendo ocorrido 35 mortes (24%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas como N1 (TNM), foi de 117,479 meses (IC 95% 107,693 a 127,265). As pacientes com envolvimento metastático axilar maior que 4 linfonodos e menor que 10 linfonodos, classificados como N2 (TNM), representaram 71 pacientes (15,5%) do total da amostra, tendo ocorrido 23 mortes (32,4%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas como N2 (TNM), foi de 101,890 meses (IC 95% 87,334 a 116,446). As pacientes com envolvimento metastático axilar maior que 10 linfonodos ou devido a presença de linfonodos fusionados, classificados como N3 (TNM), representaram 15 pacientes (3,3%) do total da amostra, tendo ocorrido 5 mortes (33,3%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificados como N3 (TNM), foi de 88,359 meses (IC 95% 61,814 a 114,905). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as quatro curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 12,729; $p=0,005$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o comprometimento metastático axilar do câncer de mama, segundo a classificação TNM (AJCC), demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria da variável que analisa o status de comprometimento dos linfonodos axilares (N), tendo como referência a categoria ausência de metástases axilares (N0) (HR=1; $p=0,007$). As pacientes que apresentaram comprometimento axilar classificadas como N1, apresentaram HR de 1,58 (IC 95% 0,97-2,57; $p=0,067$); as pacientes classificadas como N2, apresentaram HR de 2,37 (IC 95% 1,38-4,08; $p=0,002$) e as pacientes classificadas como N3, apresentaram HR de 3,0 (IC 95% 1,16-7,74; $p=0,023$) (Tabela 2).

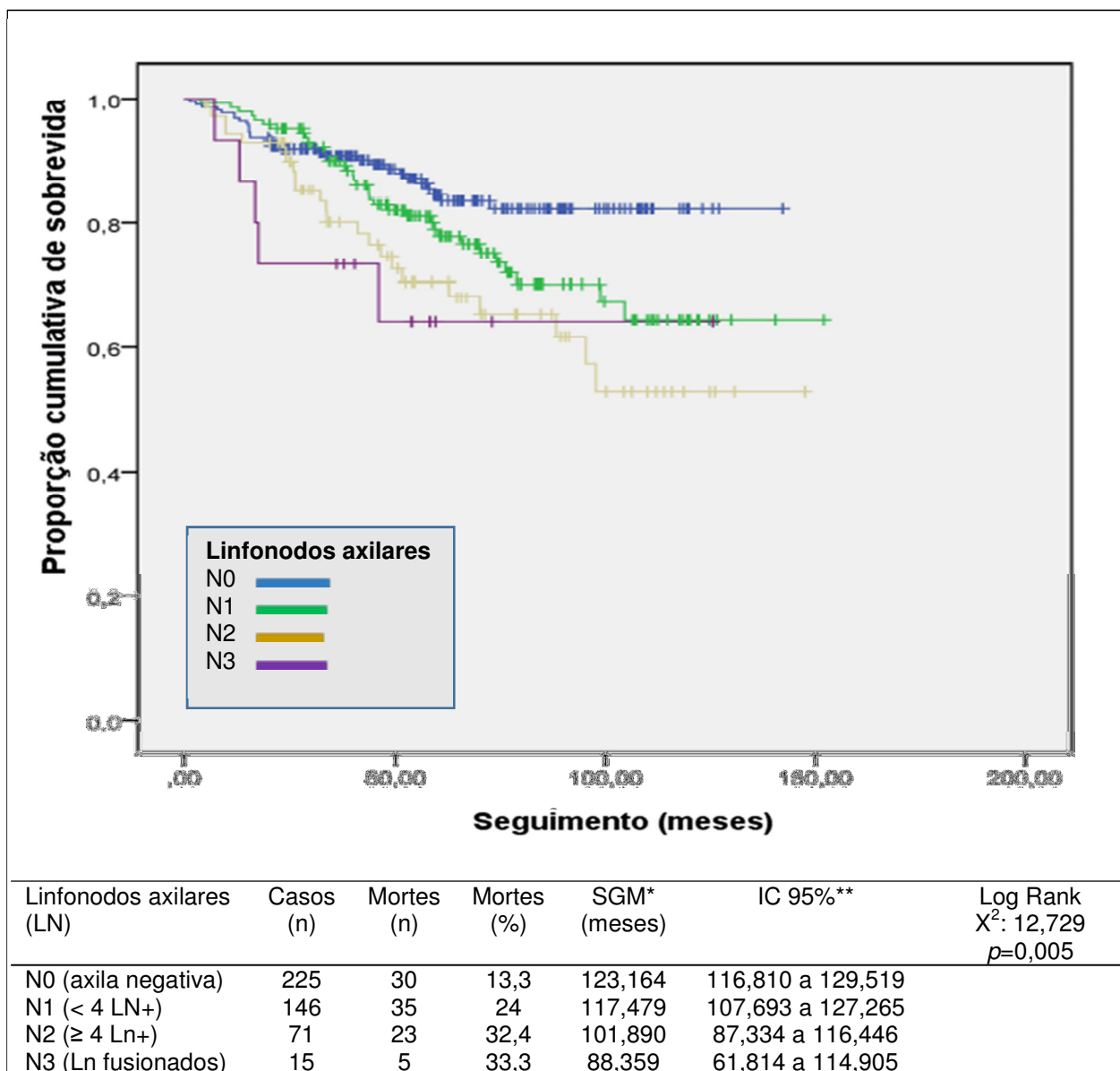


Figura 15 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama segundo o comprometimento metastático dos linfonodos axilares

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 16, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao estadiamento tumoral, conforme a Classificação de Tumores Malignos (TNM) da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), verificados nos registros das pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. As pacientes classificadas como Estágio I (TNM) representaram 91 casos (19,9%) do total da amostra, tendo ocorrido 5 mortes neste grupo, representando 5,5% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas em Estágio I (TNM), foi de 112,490 meses (IC 95% 107,244 a

117,736). As pacientes classificadas como Estágio II (TNM) representaram 249 pacientes (54,5%) do total da amostra, tendo ocorrido 50 mortes (20,1%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas em Estágio II (TNM), foi de 121,781 meses (IC 95% 114,400 a 129,162). As pacientes classificadas como Estágio III (TNM) representaram 112 pacientes (24,5%) do total da amostra, tendo ocorrido 37 mortes (33,0%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas como Estágio III (TNM), foi de 98,652 meses (IC 95% 86,821 a 110,483). As pacientes classificadas como Estágio IV (TNM) representaram 5 pacientes (1,1%) do total da amostra, tendo ocorrido 1 morte (20,0%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas como Estágio IV (TNM), foi de 96,250 meses (IC 95% 55,937 a 136,563). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as três curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 21,809; $p=0,000$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o estadiamento tumoral, segundo a classificação TNM (AJCC), demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria do estadiamento clínico, segundo os critérios TNM, tendo como referência as pacientes classificadas como Estágio Clínico I (HR=1; $p=0,000$). As pacientes classificadas como Estágio Clínico II apresentaram HR de 3,39 (IC 95% 1,35-8,51; $p=0,009$); as pacientes classificadas como Estágio Clínico III, apresentaram HR de 6,32 (IC 95% 2,49-16,08; $p=0,000$). As pacientes classificadas com Estágio IV não foram incluídas no gráfico das curvas de sobrevida (Tabela 2).

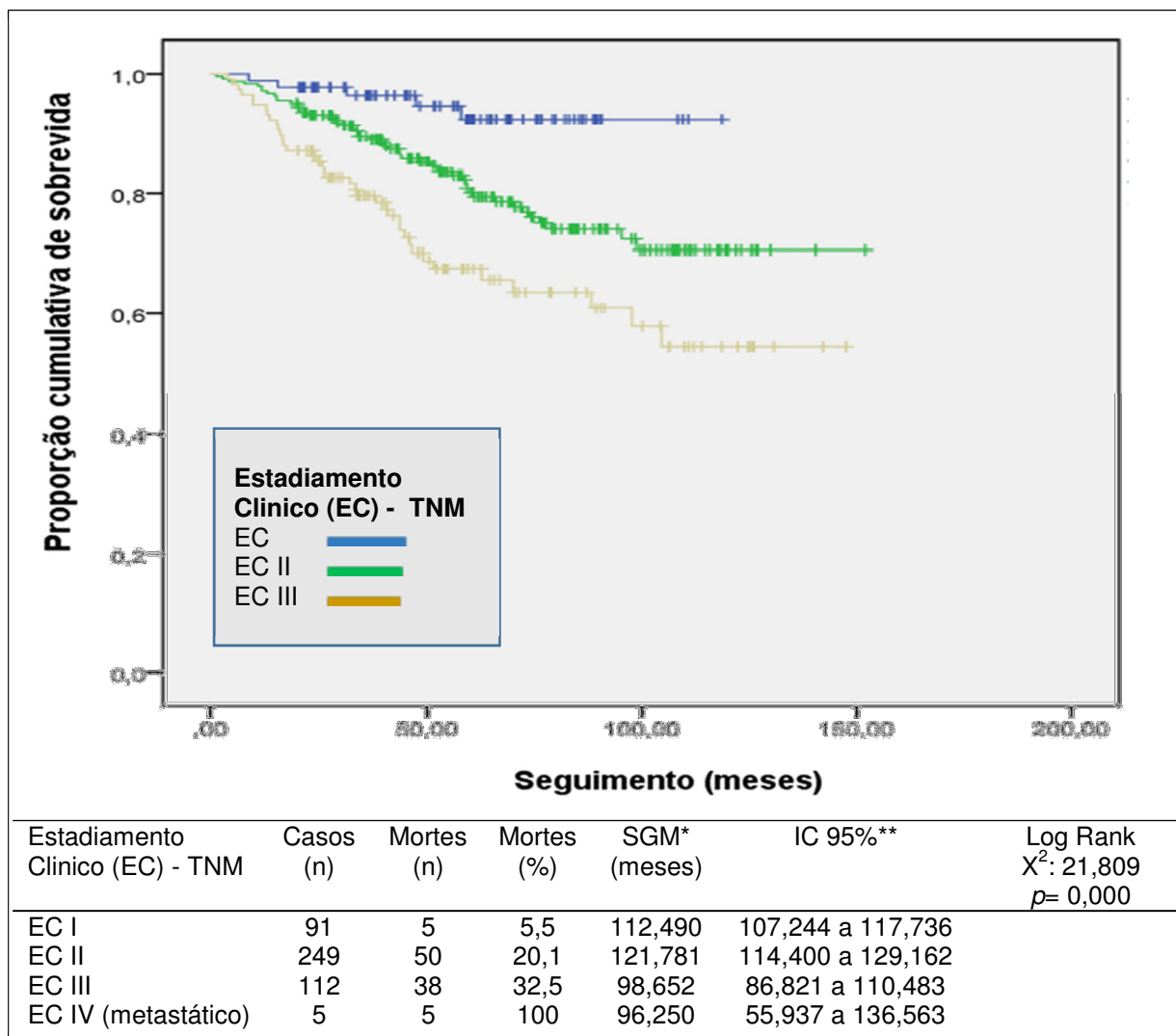


Figura 16 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama classificadas de acordo com o Estadiamento Clínico (TNM)
Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 17, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação à variável que expressa o grau histológico da diferenciação tumoral das pacientes portadoras de câncer de mama. O grau histológico baixo foi identificado em 41 pacientes (9,0%) do total da amostra, tendo ocorrido 2 mortes neste grupo, representando 4,9% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com grau histológico baixo, foi de 133,948 meses (IC 95% 122,863 a 145,039). O grau histológico intermediário foi identificado em 301 pacientes (65,8%) do total da amostra, tendo ocorrido 52 mortes neste grupo, representando 17,3% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica,

estimada para as pacientes com grau histológico intermediário, foi de 122,014 meses (IC 95% 115,740 a 128,288). O grau histológico alto foi identificado em 115 pacientes (25,2%) do total da amostra, tendo ocorrido 39 mortes neste grupo, representando 33,9% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com grau histológico alto, foi de 100,489 meses (IC 95% 87,641 a 113,337). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 22,346; $p=0,000$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o grau histológico do câncer de mama demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria da variável grau histológico, tendo como referência as pacientes classificadas com baixo grau (HR=1; $p=0,000$). As pacientes classificadas com grau intermediário apresentaram HR de 2,88 (IC 95% 0,70-11,82; $p=0,143$); e as pacientes classificadas com alto grau apresentaram HR de 6,76 (IC 95% 1,63-29,99; $p=0,008$) (Tabela 2).

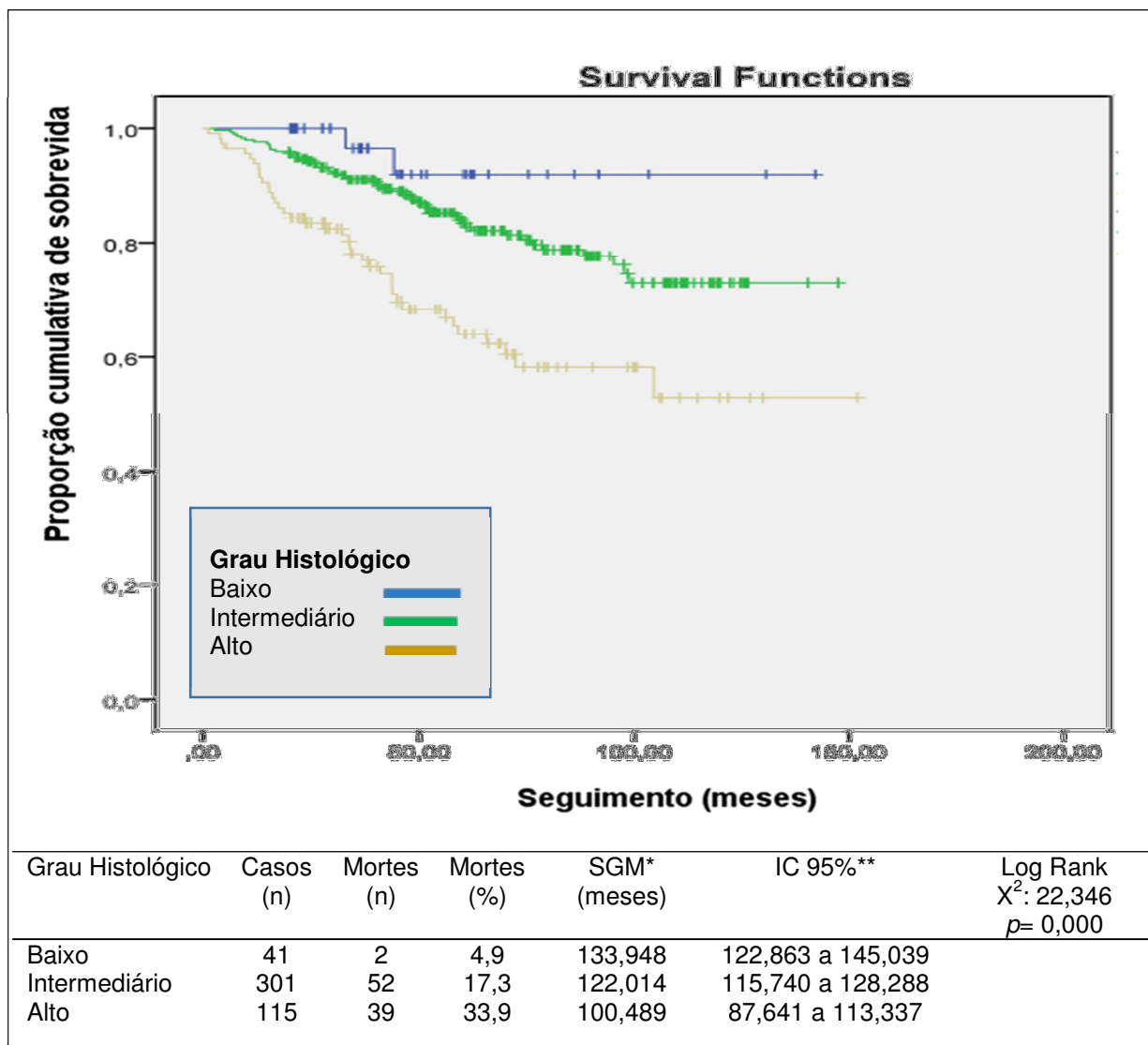


Figura 17 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o grau histológico do tumor

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 18, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao perfil da expressão dos receptores de estrogênio (RE), verificados por imuno-histoquímica, nas pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos 92 casos (20,1%) com expressão negativa para receptores estrogênicos, tendo ocorrido 26 mortes neste grupo, representando 28,3% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão negativa dos receptores estrogênicos, foi de 112,655 meses (IC 95% 100,017 a 125,293). A expressão positiva dos receptores de estrogênio foi observada em 365 casos (79,9%), tendo

ocorrido 67 mortes neste grupo, representando 18,4% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão positiva dos receptores estrogênicos, foi de 118,906 meses (IC 95% 112,722 a 125,090). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 2,525; $p=0,112$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas, de acordo com o perfil de expressão dos receptores estrogênicos no câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável expressão de receptores de estrogênio, tendo como referência as pacientes que são negativas para a expressão dos receptores estrogênicos. As pacientes que apresentaram expressão positiva para receptores estrogênicos apresentaram HR de 0,69 (IC 95% 0,44-1,09; $p=0,149$) (Tabela 2).

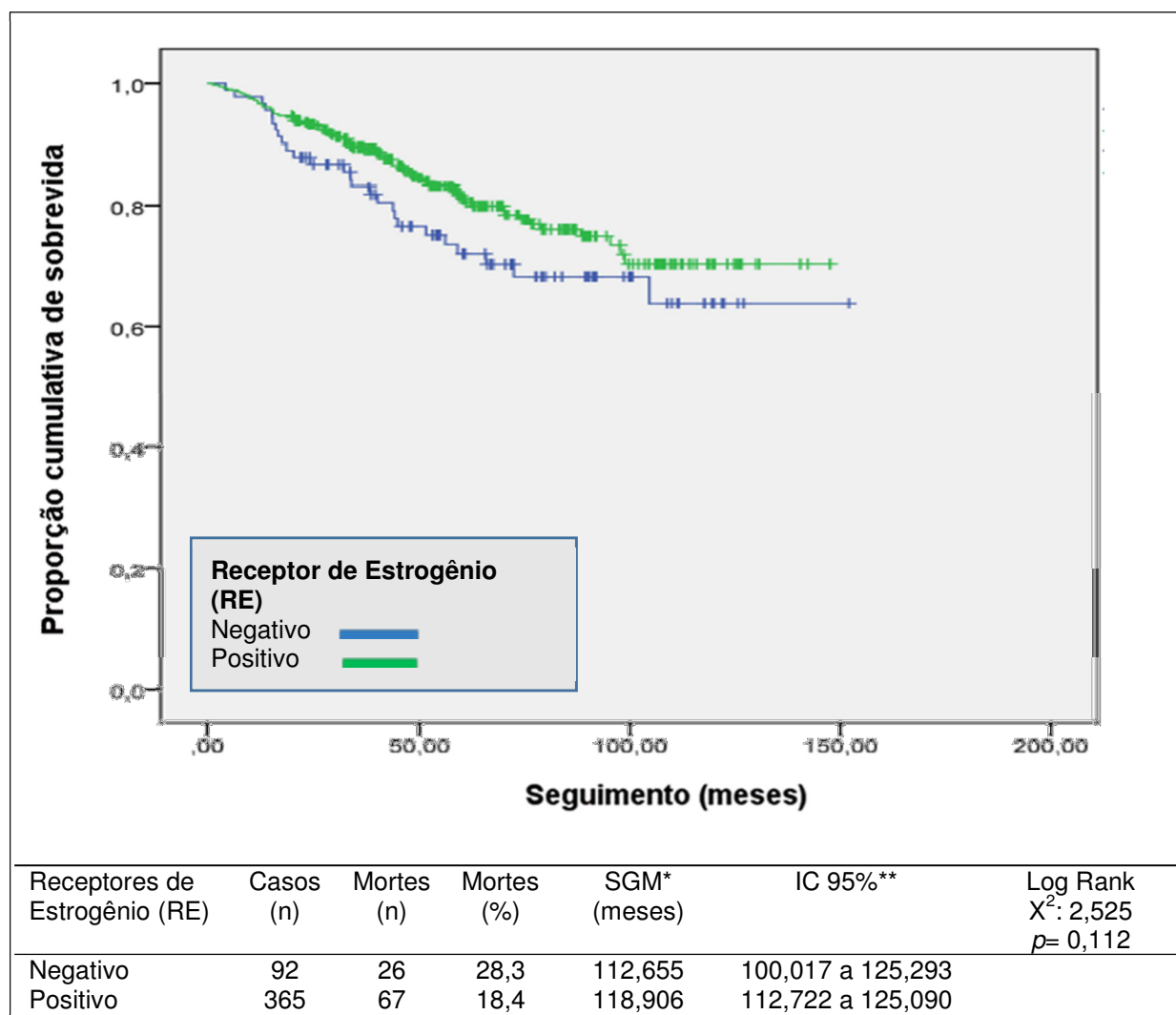


Figura 18 - Curvas de sobrevivida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil da expressão dos receptores de estrogênio (RE)

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevivida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 19, apresenta as curvas de sobrevivida global doença específica em relação ao perfil da expressão dos receptores de progesterona (RP), verificados por imuno-histoquímica, nas pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos 118 casos (25,8%) com expressão negativa para receptores de progesterona, tendo ocorrido 37 mortes neste grupo, representando 31,4% dos casos. A mediana da sobrevivida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão negativa para receptores de progesterona, foi de 107,449 meses (IC 95% 95,773 a 119,125). A expressão positiva para receptores de progesterona foi observada em 339 casos (74,2%), tendo ocorrido 56 mortes neste grupo, representando 16,5% dos casos. A

mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão positiva para receptores de progesterona, foi de 121,531 meses (IC 95% 115,291 a 127,771). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 9,891; $p=0,002$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas, de acordo com o perfil de expressão dos receptores de progesterona no câncer de mama, demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável expressão de receptores de progesterona, tendo como referência as pacientes que são negativas para a expressão dos receptores de progesterona. As pacientes que apresentaram expressão positiva para receptores de progesterona apresentaram HR de 0,52 (IC 95% 0,34-0,79; $p=0,002$) (Tabela 2).

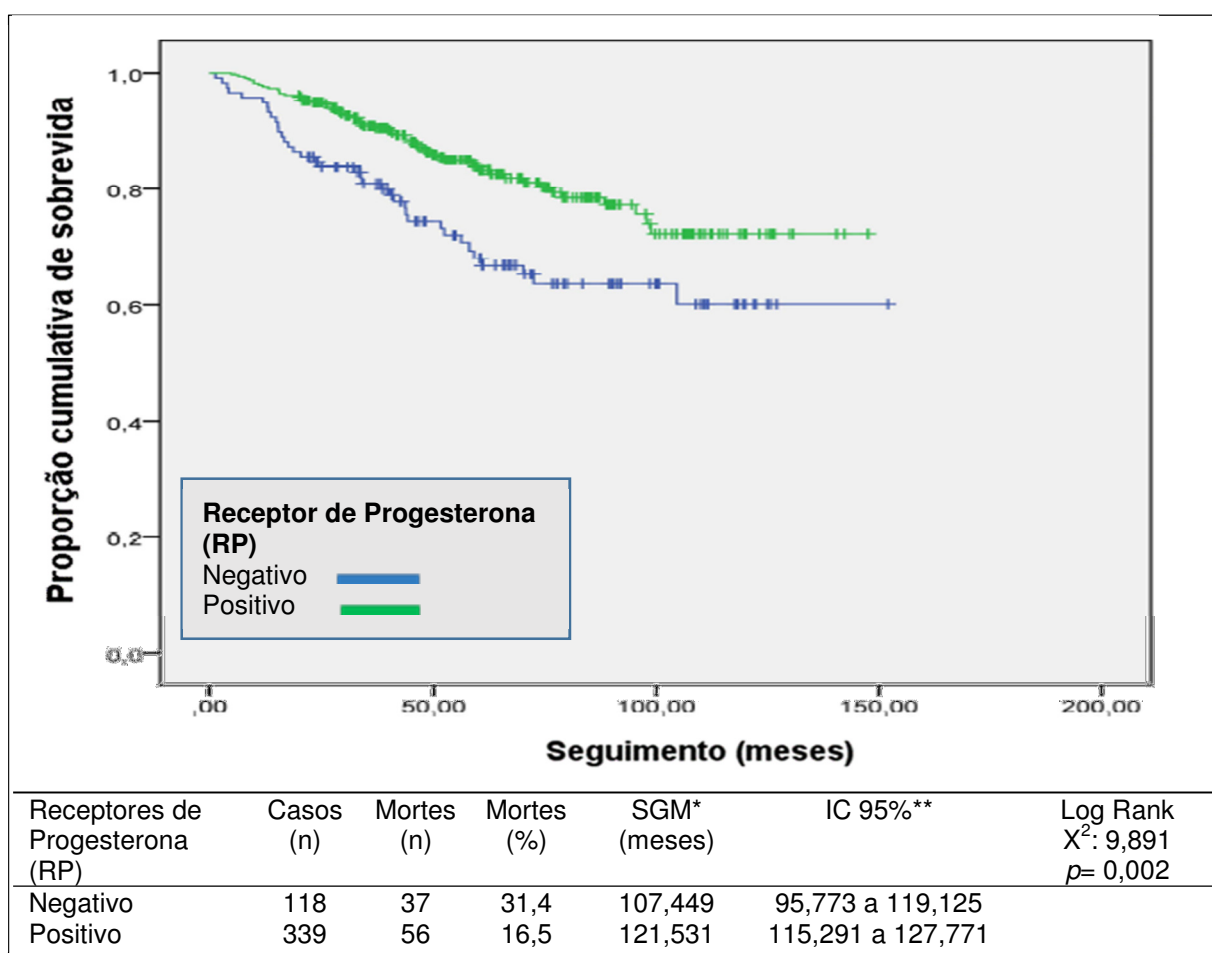


Figura 19 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil da expressão dos receptores de progesterona (RP)

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 20, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao perfil da expressão celular dos receptores hormonais (RH), agrupados conforme a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, nas pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. Foram considerados expressão positiva para receptores hormonais as pacientes que apresentaram expressão positiva para receptor de estrogênio ou de progesterona e, foram considerados expressão hormonal negativos, os casos que apresentaram negatividade para ambos os receptores. De acordo com os registros, observamos 81 casos (17,7%) com expressão negativa para receptores hormonais, tendo ocorrido 23 mortes neste grupo, representando 28,4% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão negativa para receptores hormonais, foi de 112,840 meses (IC 95% 99,479 a 126,202). A expressão positiva para receptores hormonais foi observada em 376 casos (82,3%), tendo ocorrido 70 mortes neste grupo, representando 18,6% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão positiva para receptores hormonais, foi de 118,495 meses (IC 95% 112,368 a 124,621). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 2,105; $p=0,147$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o perfil de expressão dos receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona) no câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável expressão de receptores hormonais, tendo como referência as pacientes que são negativas para a expressão dos receptores. As pacientes que apresentaram expressão positiva para receptores hormonais apresentaram HR de 0,71 (IC 95% 0,44-1,13; $p=0,149$) (Tabela 2).

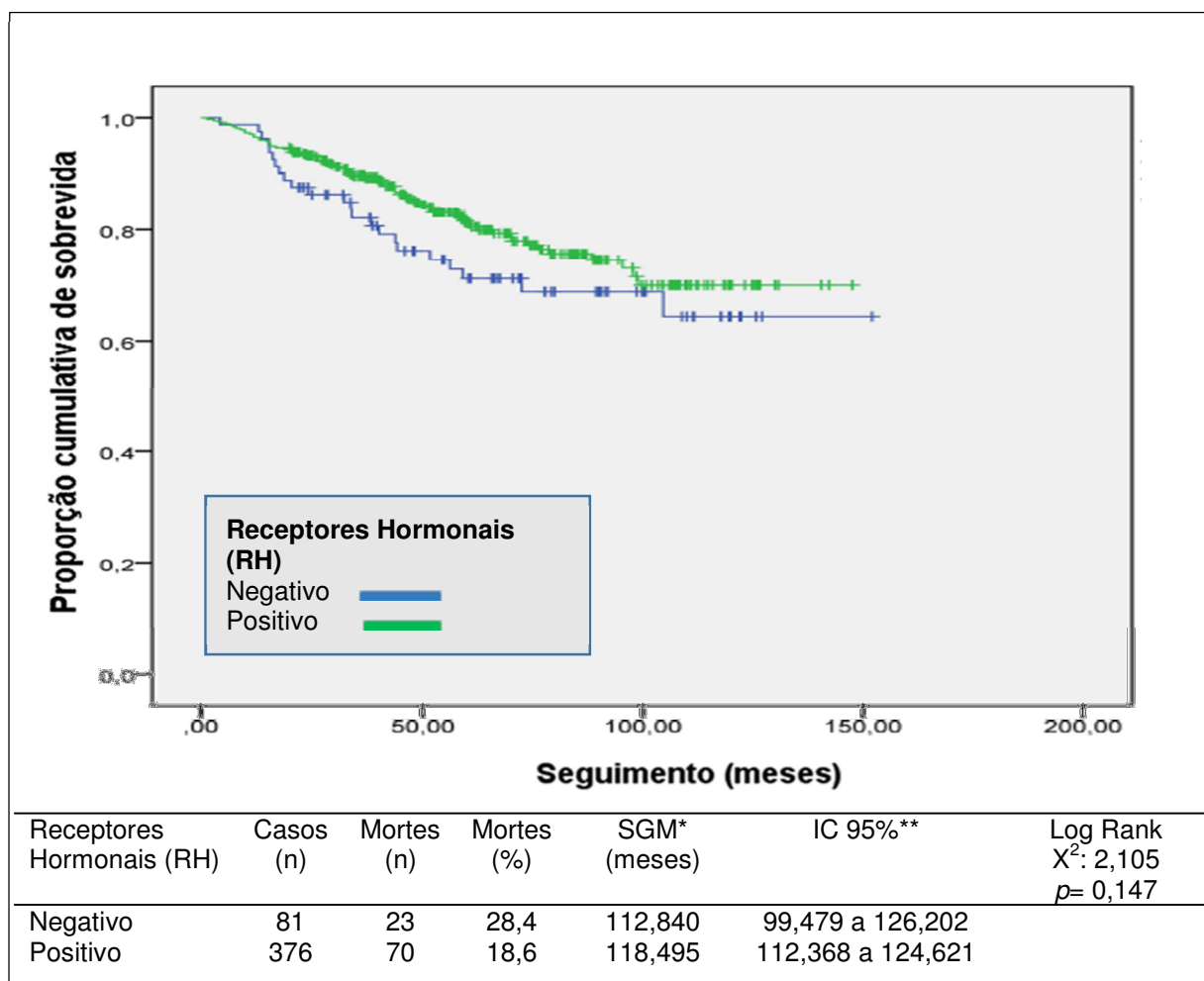


Figura 20 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil de expressão dos receptores hormonais (RH)

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 21, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao perfil da expressão dos receptores Her-2, verificado por imunohistoquímica, nas pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos 367 casos (80,3%) com expressão negativa para receptores Her-2, tendo ocorrido 75 mortes nesse grupo, representando 20,4% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão negativa para receptores Her-2, foi de 120,033 meses (IC 95% 112,770 a 127,296). A hiperexpressão de receptores Her-2 foi observada em 90 casos (19,7%), tendo ocorrido 18 mortes nesse grupo, representando 20% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a hiperexpressão de receptores Her-2, foi de 113,332 meses (IC 95%

104,644 a 122,020). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 0,032; $p=0,858$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas, de acordo com o perfil de expressão dos receptores Her-2 no câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para o perfil da expressão do Her-2, tendo como referência as pacientes classificadas como baixo grau de expressão ou ausência de expressão. As pacientes classificadas com hiperexpressão de Her-2 apresentaram HR de 1,04 (IC 95% 0,68-1,60; $p=0,858$) (Tabela 2).

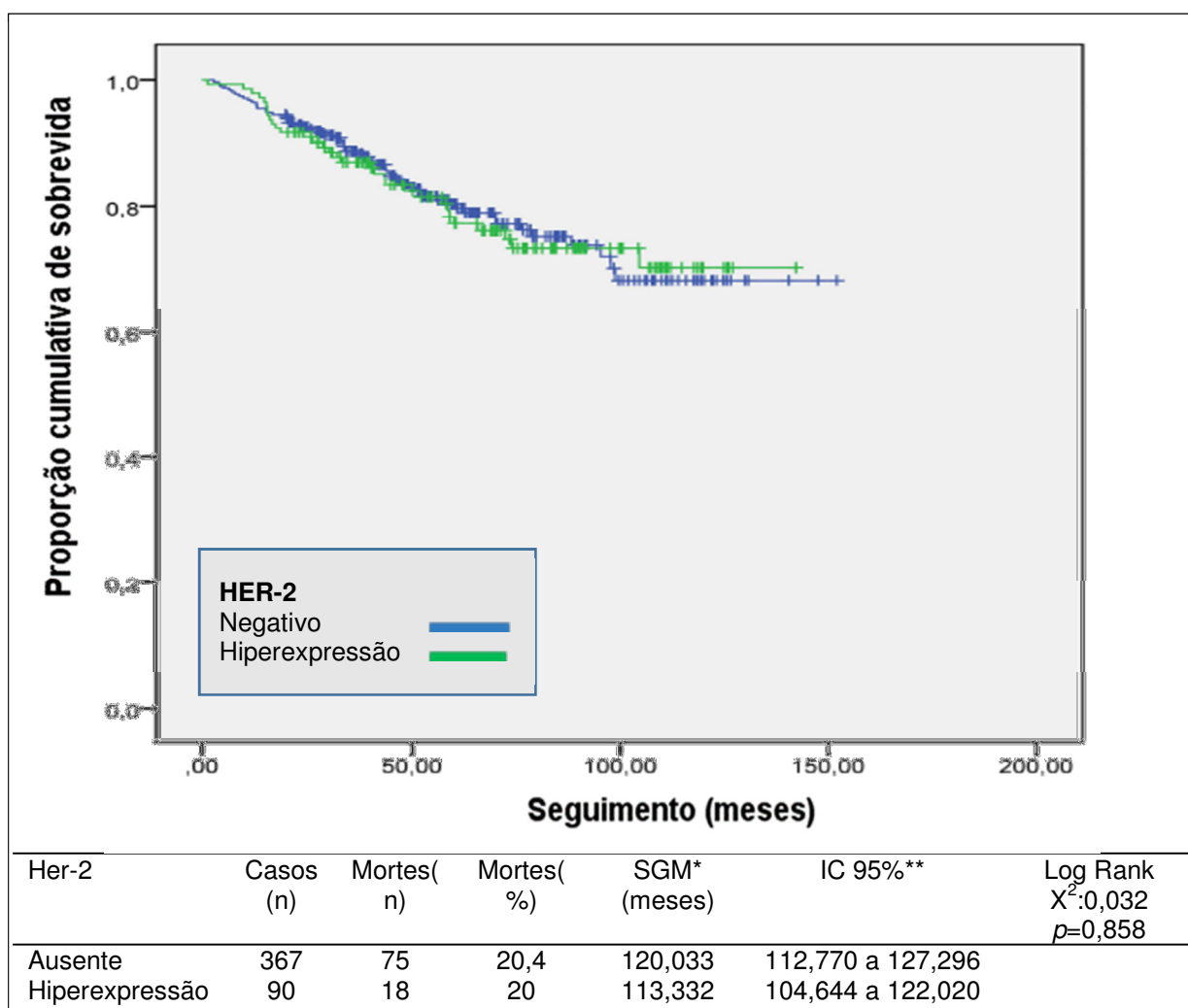


Figura 21 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil de expressão do Her-2

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 22, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao perfil de expressão do índice de proliferação celular Ki-67, verificado por imuno-histoquímica, nas pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos 132 casos (28,9%) de baixo grau de expressão do Ki-67 (score patológico < 14%), tendo ocorrido 21 mortes neste grupo, representando 15,9% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes classificadas com baixo grau de expressão do Ki-67, foi de 124,810 meses (IC 95% 115,991 a 133,630). As pacientes com alto grau de expressão do Ki-67 (score patológico \geq 14%) foi observada em 325 casos (71,1%), tendo ocorrido 72 mortes neste grupo, representando 22,2% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes classificadas com alto grau de expressão do Ki-67, foi de 116,320 meses (IC 95% 109,043 a 123,598). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 3,142; $p=0,076$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o grau de expressão do índice de proliferação Ki-67 no câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para a variável expressão imuno-histoquímica do índice de proliferação celular ki-67, tendo como referência as pacientes classificadas com baixo grau de expressão. As pacientes classificadas com alto grau de expressão do ki-67 apresentaram HR de 1,55 (IC 95% 0,95-2,52; $p=0,079$) (Tabela 2).

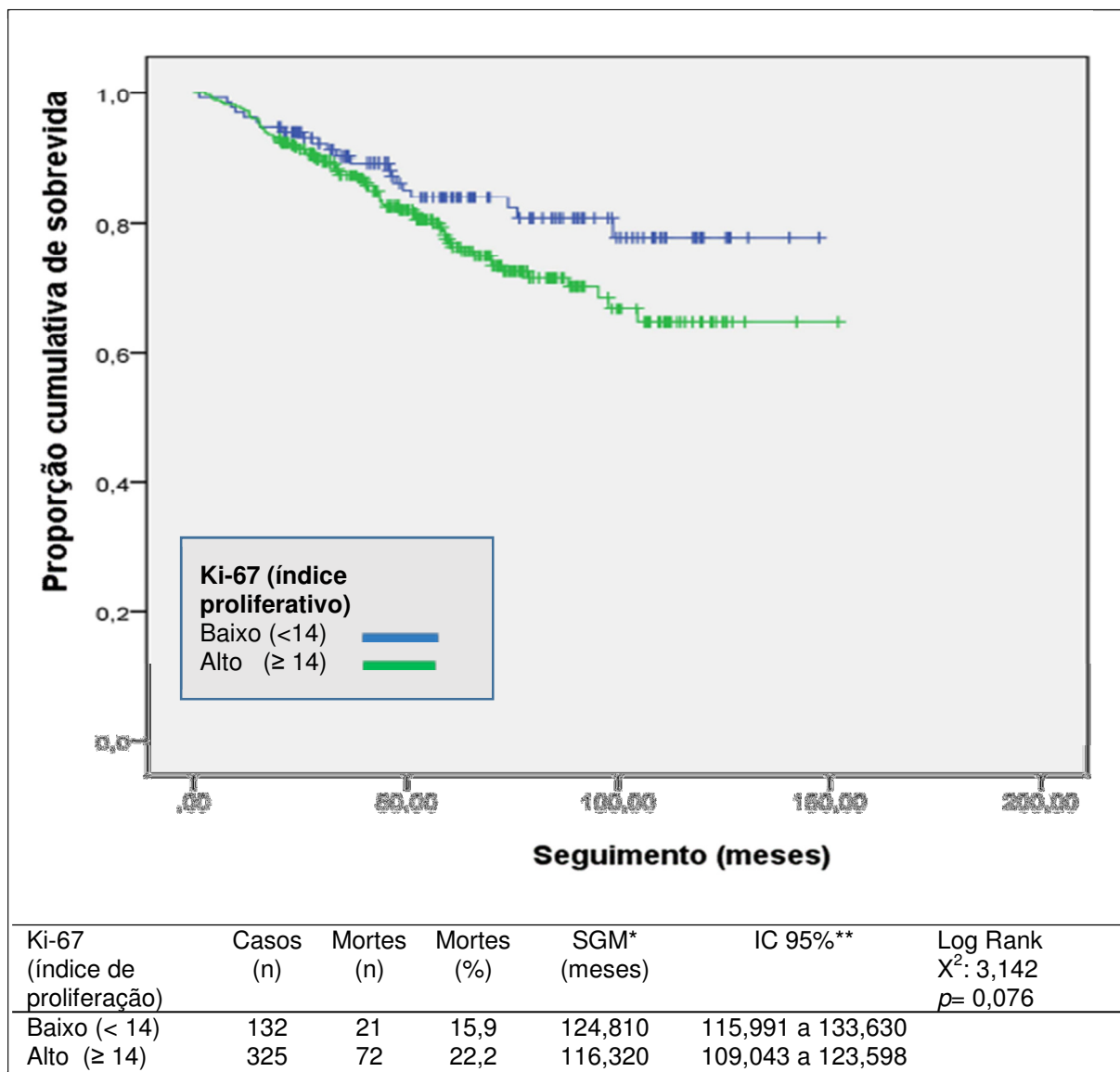


Figura 22 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o grau de expressão do índice de proliferação celular (Ki-67)

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 23, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao perfil molecular que foram obtidos a partir dos registros histopatológicos e imuno-histoquímicos da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama. Para obtenção do perfil molecular, os casos foram agrupados de acordo com os critérios preconizados pelo Consenso de St Gallen de 2013. As pacientes categorizadas como perfil molecular Luminal A representaram 111 casos (24,3%) do total da amostra, tendo ocorrido 20 mortes neste grupo, representando 16,2% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica estimada, para pacientes com perfil

molecular Luminal A, foi de 123,844 meses (IC 95% 113,938 a 133,749). As pacientes categorizadas como perfil Luminal B Her-2(-) representaram 216 pacientes (47,3%) do total da amostra, tendo ocorrido 41 mortes (19,2%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica estimada, para pacientes com perfil molecular Luminal B Her-2(-), foi de 111,361 meses (IC 95% 102,714 a 119,720). As pacientes categorizadas como perfil Luminal B Her-2(+) representaram 64 pacientes (14%) do total da amostra, tendo ocorrido 11 mortes (17,2%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas com perfil Luminal B Her-2(+), foi de 107,149 meses (IC 95% 97,050 a 117,247). As pacientes classificadas como perfil Her-2 hiperexpresso representaram 26 pacientes (5,6%) do total da amostra, tendo ocorrido 7 mortes (26,9%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas com o perfil Her-2 hiperexpresso, foi de 98,006 meses (IC 95% 79,876 a 116,135). As pacientes classificadas como perfil Triplo negativo representaram 40 pacientes (8,8%) do total da amostra, tendo ocorrido 16 mortes (40%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para pacientes classificadas com o perfil Triplo negativo, foi de 99,413 meses (IC 95% 79,606 a 119,220). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 8,451; $p=0,076$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o perfil molecular do câncer de mama demonstraram que não há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados pelo modelo univariado para cada categoria do perfil molecular do câncer de mama, tendo como referência os tumores com perfil molecular Luminal A (HR=1; $p=0,083$). As pacientes classificadas com perfil molecular Luminal B (her-2 negativo) apresentaram HR de 1,20 (IC 95% 0,69-2,10; $p=0,513$); as pacientes classificadas com perfil molecular Luminal B (Her-2 positivo) apresentaram HR de 0,96 (IC 95% 0,45-2,03; $p=0,915$); as pacientes classificadas com perfil molecular Her-2 Hiperexpresso apresentaram HR de 1,49 (IC 95% 0,62-3,58; $p=0,368$) e as pacientes classificadas com perfil molecular Triplo negativo apresentaram HR de 2,33 (IC 95% 1,19-4,58; $p=0,014$) (Tabela 2).

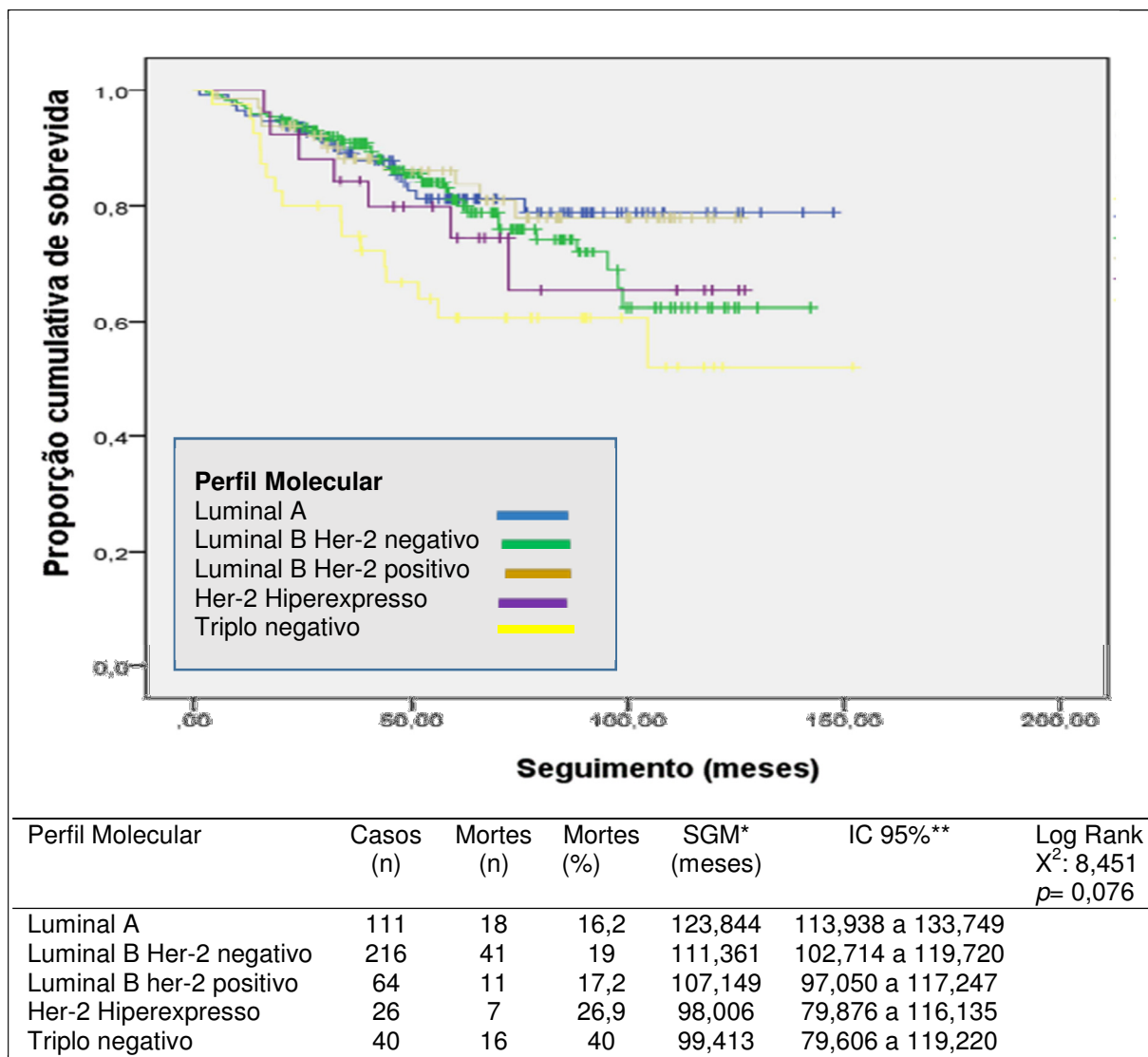


Figura 23 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o perfil molecular

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 24, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação ao tipo de procedimento cirúrgico realizado nas pacientes portadoras de câncer de mama da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos que 181 pacientes realizaram cirurgia conservadora (setorectomia) representando 39,6% dos casos, tendo ocorrido 23 mortes (12,7%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que realizaram cirurgia conservadora (setorectomia), foi de 129,845 meses (IC 95% 121,464 a 138,222). As pacientes que realizaram cirurgia radical (mastectomia) representaram 275 casos (60,2%), tendo ocorrido 70 mortes (25,4%) neste grupo. A mediana da sobrevida

global doença específica, estimada para as pacientes submetidas a cirurgia radical (mastectomia), foi de 111,404 meses (IC 95% 104,141 a 118,667). Observamos nos registros que 1 paciente não foi submetida a procedimentos cirúrgicos representando 0,2% dos casos. O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 9,943; $p=0,002$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com o tipo de procedimento cirúrgico realizado nas pacientes portadoras de câncer de mama, demonstraram que há diferença significativa entre elas em todas as fases das curvas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável tipo de procedimento cirúrgico realizado, tendo como referência as pacientes que foram submetidas a cirurgia conservadora. As pacientes que foram submetidas a cirurgia radical (mastectomia) apresentaram HR de 2,10 (IC 95% 1,31-3,36; $p=0,002$) (Tabela 2).

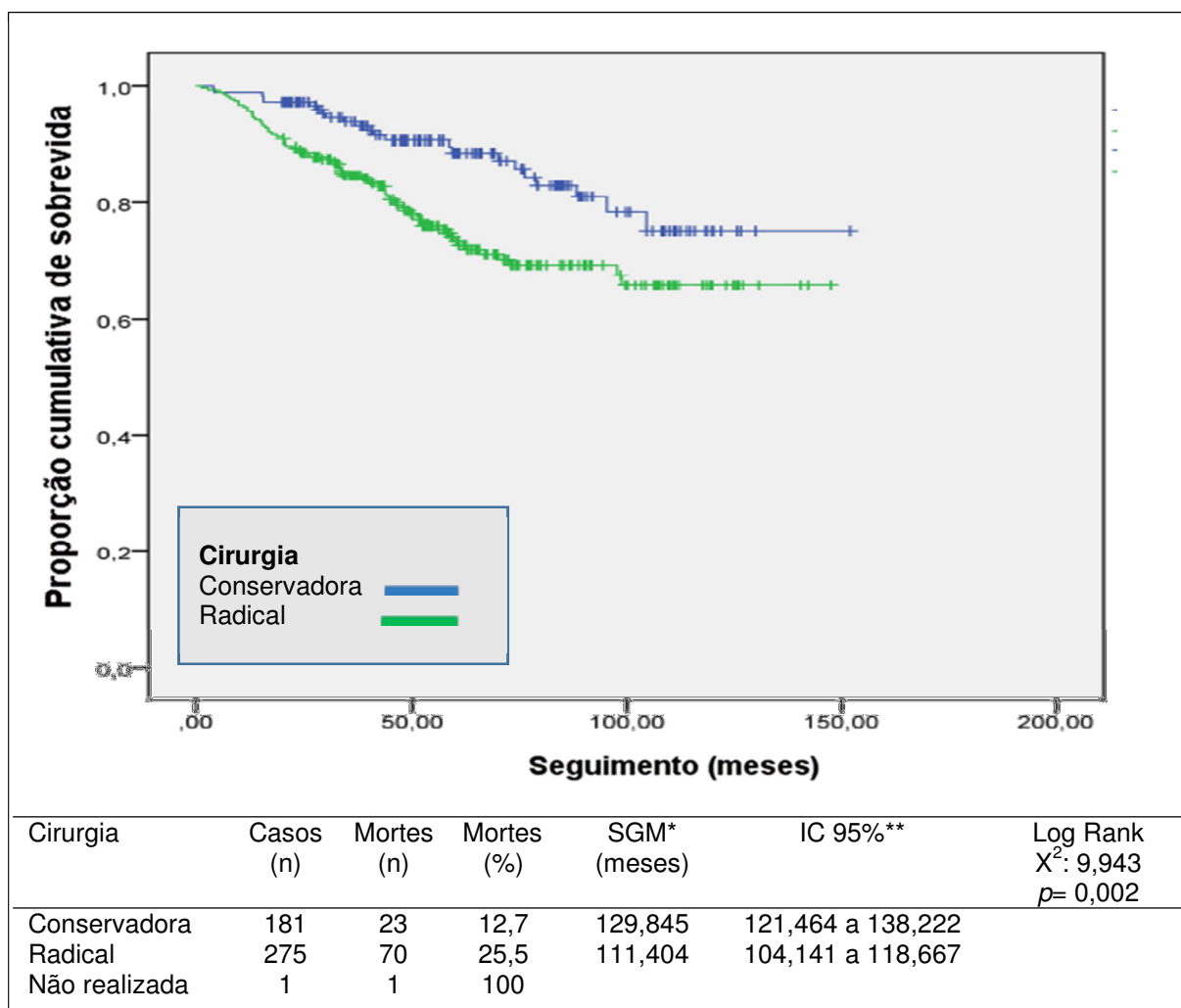


Figura 24 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com o tipo de cirurgia realizada

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 25, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica, em relação à realização ou não de quimioterapia anti-neoplásica adjuvante nas pacientes portadoras de câncer de mama, da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos que 117 pacientes não realizaram tratamento quimioterápico representando 25,6% dos casos, tendo ocorrido 23 mortes (19,7%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que não realizaram quimioterapia adjuvante, foi de 97,009 meses (IC 95% 89,170 a 104,847). As pacientes que realizaram tratamento quimioterápico adjuvante representaram 340 casos (74,4%), tendo ocorrido 70 mortes (20,6%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que realizaram quimioterapia adjuvante, foi de 120,459 meses (IC 95% 113,393 a

127,524). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida ($X^2: 0,235; p=0,628$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com a realização ou não de tratamento quimioterápico adjuvante nas pacientes portadoras de câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável realização ou não de quimioterapia anti-neoplásica adjuvante, tendo como referência as pacientes que não realizaram a quimioterapia. As pacientes que realizaram quimioterapia anti-neoplásica adjuvante apresentaram HR de 0,89 (IC 95% 0,55-1,43; $p=0,628$) (Tabela 2).

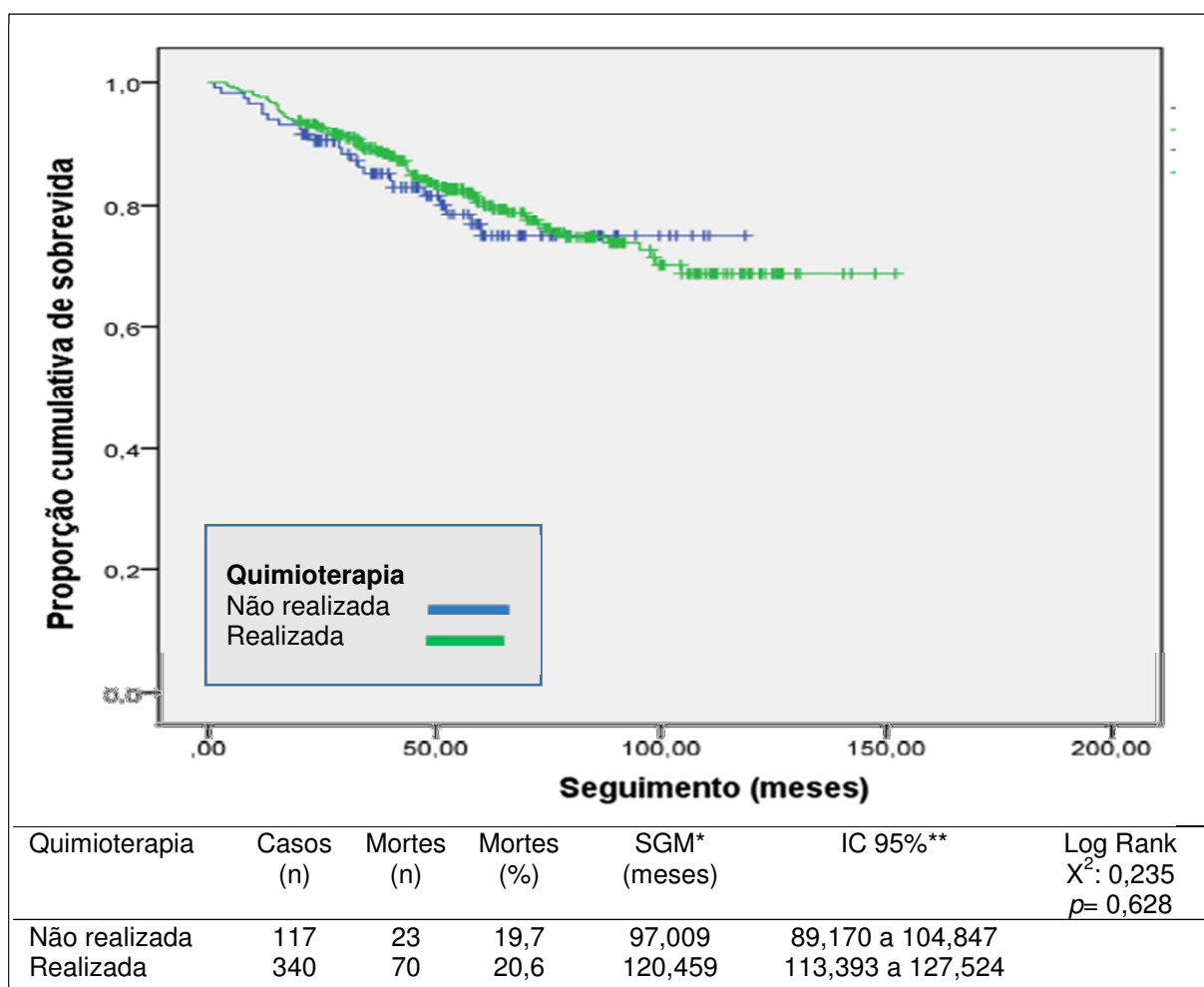


Figura 25 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não de quimioterapia adjuvante

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 26, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação à realização ou não de radioterapia adjuvante nas pacientes portadoras de câncer de mama, da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos que 168 pacientes não realizaram tratamento radioterápico representando 36,8% dos casos, tendo ocorrido 34 mortes (20,2%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que não realizaram radioterapia adjuvante foi de 99,673 meses (IC 95% 92,941 a 106,405). As pacientes que realizaram tratamento radioterápico adjuvante representaram 289 casos (63,2%), tendo ocorrido 59 mortes (20,4%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que realizaram radioterapia adjuvante, foi de 120,459 meses (IC 95% 113,393 a 127,524). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 0,014; $p=0,905$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com a realização ou não de tratamento radioterápico adjuvante, nas pacientes portadoras de câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável realização ou não de radioterapia adjuvante, tendo como referência as pacientes que não realizaram a radioterapia. As pacientes que realizaram radioterapia adjuvante apresentaram HR de 0,98 (IC 95% 0,64-1,49; $p=0,905$) (Tabela 2).

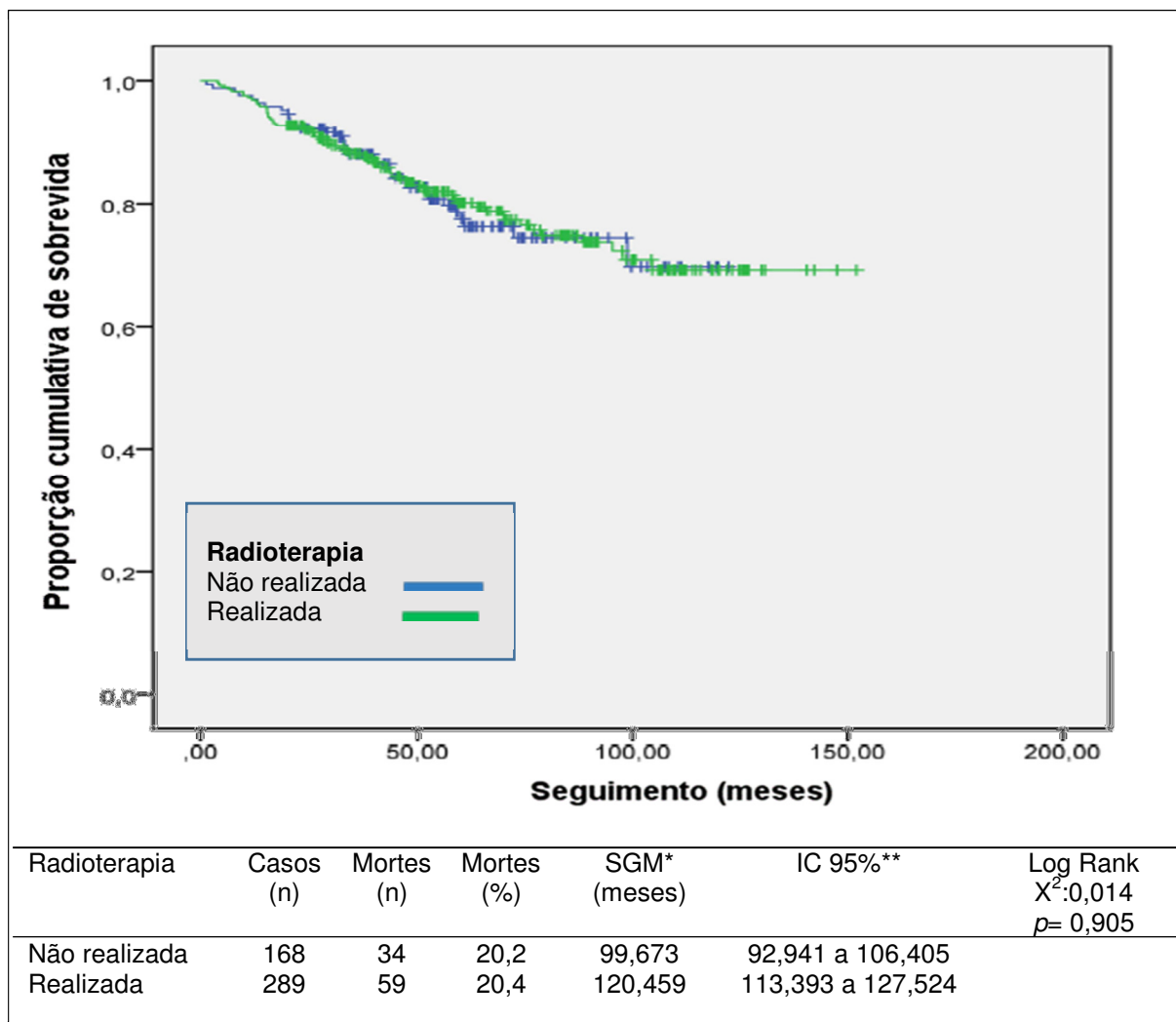


Figura 26 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não de radioterapia adjuvante

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 27, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação a realização ou não de hormonioterapia anti-neoplásica adjuvante nas pacientes portadoras de câncer de mama, da coorte estudada. De acordo com os registros, observamos que 89 pacientes não realizaram tratamento hormonioterápico, representando 19,5% dos casos, tendo ocorrido 26 mortes (29,2%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que não realizaram hormonioterapia adjuvante, foi de 111,929 meses (IC 95% 99,152 a 124,706). As pacientes que realizaram tratamento hormonioterápico adjuvante representaram 368 casos (80,5%), tendo ocorrido 67 mortes (18,2%) neste grupo. A mediana da sobrevida global doença específica,

estimada para as pacientes que realizaram hormonioterapia adjuvante, foi de 118,912 meses (IC 95% 112,711 a 125,113). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida ($X^2: 3,078$; $p=0,079$). Assim, as curvas de sobrevida, estratificadas de acordo com a realização ou não de tratamento hormonioterápico adjuvante nas pacientes portadoras de câncer de mama, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$), porém com tendência a significância no meio e final das curvas.

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável realização ou não de hormonioterapia anti-neoplásica adjuvante, tendo como referência as pacientes que não realizaram a hormonioterapia. As pacientes que realizaram hormonioterapia anti-neoplásica adjuvante apresentaram HR de 0,67 (IC 95% 0,42-1,05; $p=0,081$) (Tabela 2).

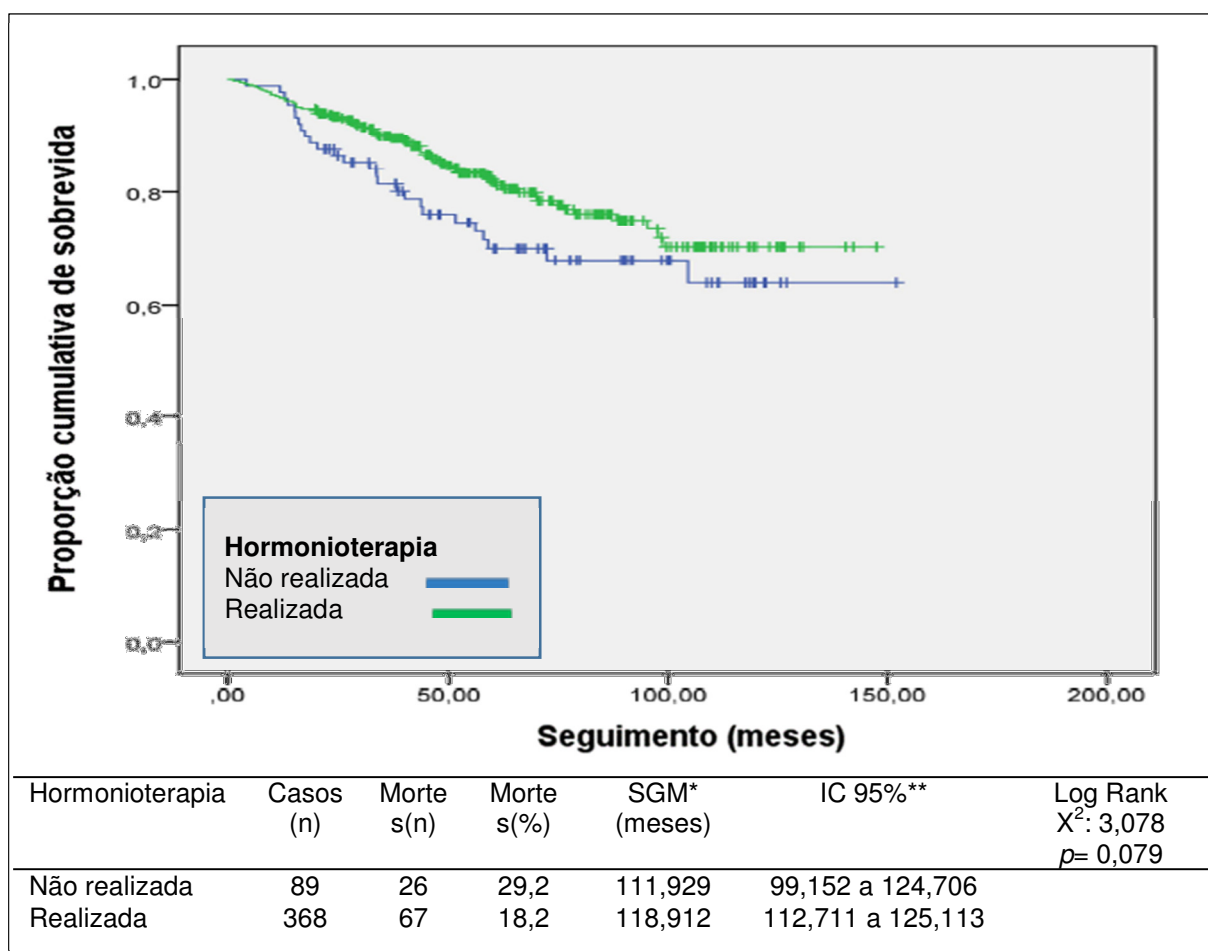


Figura 27 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não de hormonioterapia adjuvante

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

A Figura 28, apresenta as curvas de sobrevida global doença específica em relação a realização ou não da terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin® nas pacientes portadoras de câncer de mama, que apresentaram perfil Her-2 hiperexpresso na coorte estudada. De acordo com os registros, observamos que 90 pacientes apresentavam hiperexpressão, representando 19,7% dos casos. Deste grupo de pacientes com perfil Her-2 hiperexpresso, 41 pacientes (45,6%) não receberam terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin®. Neste grupo observamos 13 mortes, representando 31,7% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que não realizaram terapia alvo anti-her-2 com Herceptin® foi, de 113,604 meses (IC 95% 102,267 a 124,942). O tratamento alvo anti-her-2 com Herceptin® foi realizada em 49 pacientes (54,4%), tendo ocorrido 5 mortes (10,2%) neste grupo de pacientes. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes que realizaram terapia alvo com Herceptin® adjuvante, foi de 119,017 meses (IC 95% 112,958 a 125,075). O teste de *log-rank* global não rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 1,825; $p=0,177$). Assim, as curvas de sobrevida estratificadas de acordo com a realização ou não da terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin® nas pacientes portadoras de câncer de mama, Her-2 Hiperexpresso, demonstraram que não há diferença significativa entre elas ($p>0,05$), porém com tendência a significância no meio e final das curvas.

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para a variável realização ou não de terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin®, tendo como referência as pacientes que não realizaram a terapia alvo anti-Her-2. As pacientes que realizaram a terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin® apresentaram HR de 0,54 (IC 95% 0,22-1,34; $p=0,184$) (Tabela 2).

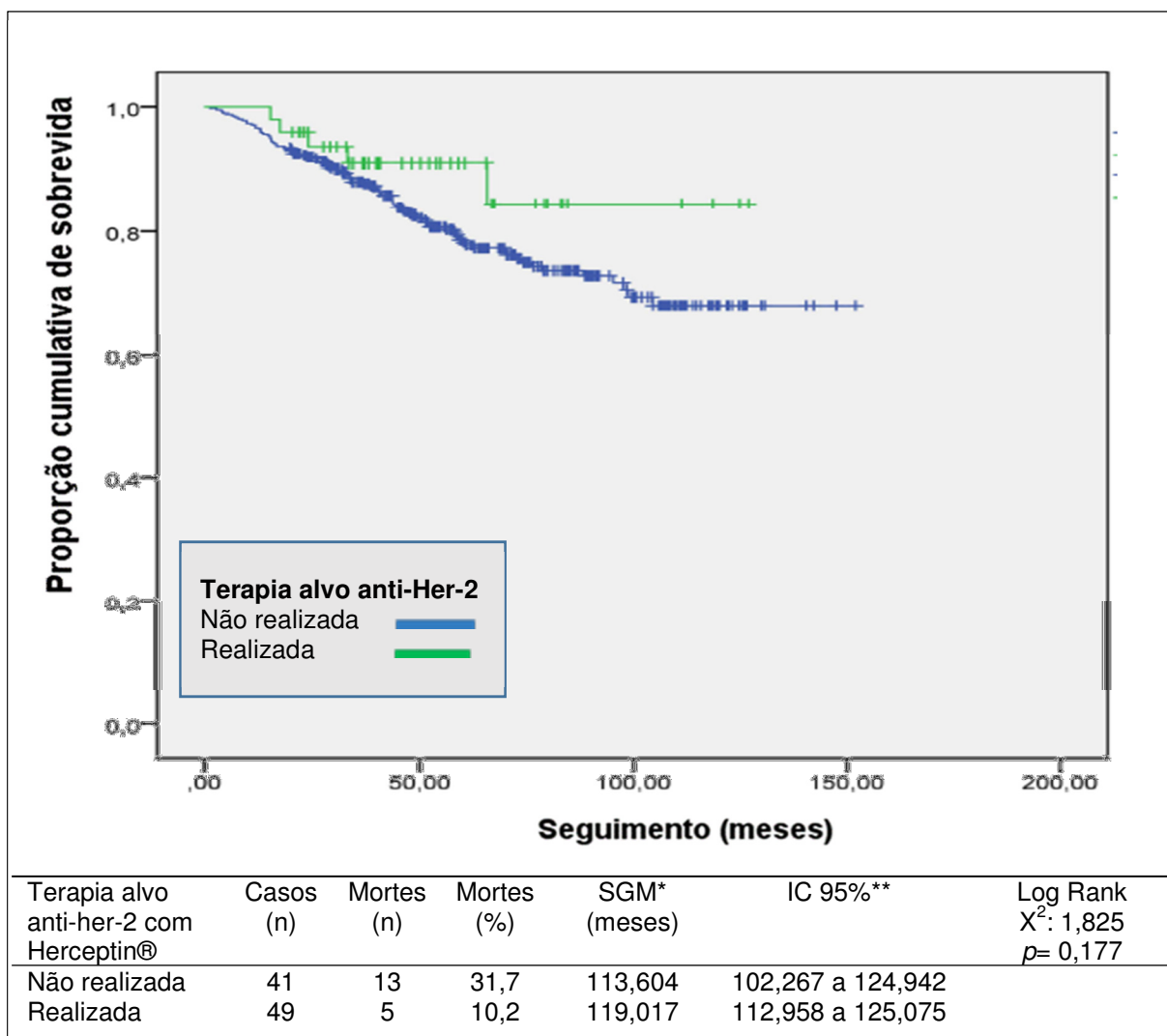


Figura 28 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com a realização ou não da terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin®

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

Tabela 2 - Análise Univariada das variáveis prognósticas para a ocorrência de morte na coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama

Variáveis	HR*	IC 95%***	p***
Faixa etária (anos)			
<50	1****		0,000
50-59	1,03	(0,54 – 1,96)	0,942
60-69	1,88	(1,02 – 3,44)	0,042
≥70	2,92	(1,70 – 5,01)	0,000
Histologia			
Ductal invasor	1****		0,177
Lobular invasor	1,48	(0,83 – 2,66)	0,199
Mucinoso	0,34	(0,05 – 2,43)	0,280

Variáveis	HR*	IC 95%***	P***
Tumor – tamanho			
T1 (< 2 cm)	1****		0,000
T2 (2 a 4,9 cm)	1,86	(1,04 – 3,36)	0,038
T3 (≥ 5 cm)	3,84	(1,83 – 8,08)	0,000
T4 (Inflamatório)	5,12	(2,32–11,29)	0,00
Linfonodos axilares			
N0 (negativos)	1****		0,007
N1(<4 linfonodos positivos)	1,58	(0,97 – 2,57)	0,067
N2(≥4 linfonodos positivos)	2,37	(1,38 - 4,08)	0,002
N3 (Linfonodos fusionados positivos)	3,00	(1,16 - 7,74)	0,023
Estadiamento (TNM)			
I	1****		0,000
II	3,39	(1,35 – 8,51)	0,009
III	6,32	(2,49–16,08)	0,00
Grau Histológico			
Baixo	1****		0,000
Intermediário	2,88	(0,70–11,82)	0,143
Alto	6,32	(1,63–29,99)	0,008
Receptor Estrogênio (RE)			
Negativo	1****		
Positivo	0,69	(0,44 – 1,09)	0,114
Receptor Progesterona (RP)			
Negativo	1****		
Positivo	0,52	(0,34 – 0,79)	0,002
Receptor Hormonal (RH)			
Negativo	1****		
Positivo	0,71	(0,44 – 1,13)	0,149
HER- 2			
Negativo	1****		
Hiperexpresso	1,04	(0,68 – 1,60)	0,858
Ki-67 (índice de proliferação)			
Baixo	1****		
Alto	1,55	(0,95 – 2,52)	0,079
Perfil Molecular			
Luminal A	1****		0,083
Luminal B HER-2 negativo	1,20	(0,69 – 2,10)	0,513
Luminal B HER-2 positivo	0,96	(0,45 – 2,03)	0,915
HER-2 superexpresso	1,49	(0,62 – 3,58)	0,368
Tripló negativo	2,33	(1,19 – 4,58)	0,014
Cirurgia			
Conservadora	1****		
Radical	2,10	(1,31 – 3,36)	0,002
Quimioterapia			
Não realizada	1****		
Realizada	0,89	(0,55 – 1,43)	0,628
Radioterapia			
Não realizada	1****		
Realizada	0,98	(0,64 – 1,49)	0,905

Variáveis	HR*	IC 95%***	P***
Hormonioterapia			
Não realizada	1****		
Realizada	0,67	(0,42 – 1,05)	0,081
Herceptin® (alvo anti-Her-2)			
Não realizado	1****		
Realizado	0,54	(0,22 – 1,34)	0,184
SIRT-1			
Negativo	1****		
Hiperexpresso	2,66	(1,03 – 6,86)	0,043

Fonte: O autor (2016)

* Hazard Ratio (HR) obtido pelo modelo de riscos proporcionais de Cox

** Intervalo de confiança

*** Significância estatística

**** Categoria de base ou referência

De acordo com o objetivo principal da pesquisa foi realizada a análise da expressão da Sirtuina-1 (SIRT-1) em tecido tumoral de blocos de parafina através da técnica de imuno-histoquímica. Foram selecionados 123 blocos de parafina de pacientes portadoras de câncer de mama, conforme critérios apresentados na metodologia da pesquisa. As análises foram realizadas pela equipe de Patologistas do Laboratório Medicina Diagnóstica em Erechim-RS.

Os 123 casos selecionados para investigação da SIRT-1 representaram 26,9% do total da coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama (n=457). A Tabela 3 apresenta a descrição das variáveis pesquisadas que compuseram a coorte total (n=457) e a coorte de SIRT-1 (n=123).

Tabela 3 - Descrição e frequência das variáveis pesquisadas para composição da coorte total e coorte da SIRT-1

	Coorte total		Coorte SIRT-1		P*
	n=457	%	n=123	%	
Idade (anos)					
< 50	149	32,6	48	39,0	0,045
50 - 59	115	25,2	28	22,8	
60 – 69	90	19,7	26	21,1	
≥ 70	103	22,5	21	17,1	
Histologia					
Ductal invasor	396	86,9	105	85,4	0,609
Lobular invasor	48	10,5	16	13,0	
Mucinoso	12	2,6	2	1,6	
Tamanho do tumor					
T1 (< 2 cm)	131	28,7	30	24,4	0,103
T2 (2 a 4,9 cm)	265	58,0	71	57,7	
T3 (≥ 5 cm)	34	7,4	17	13,8	
T4 (Inflamatório)	27	5,9	5	4,1	

	Coorte total		Coorte SIRT-1		P*
	n=457	%	n=123	%	
Linfonodos axilares					
N0 (negativos)	225	49,2	48	39,0	0,008
N1 (< 4 linfonodos positivos)	146	31,9	45	36,6	
N2 (≥ 4 linfonodos positivos)	71	15,5	27	22,0	
N3 (Linfonodos fusionados positivos)	15	3,3	3	2,4	
Metástase					
Sem	452	98,9	122	88	0,569
Com	5	1,1	1	5	
Estadiamento (TNM)					
I	91	19,9	17	13,8	0,032
II	249	54,5	68	55,3	
III	112	24,5	37	30,1	
IV	5	1,1	1	0,8	
Grau					
Baixo	41	9,0	5	4,1	0,111
Intermediário	301	65,8	84	68,3	
Alto	115	25,2	34	27,6	
Receptor estrogênio (RE)					
Negativo	92	20,1	27	22,0	0,556
Positivo	365	79,9	96	78,0	
Receptor progesterona(RP)					
Negativo	118	25,8	30	24,4	0,672
Positivo	339	74,2	93	75,6	
HER-2					
Negativo	367	80,3	93	75,6	0,108
Hiperexpresso	90	19,7	30	24,4	
Ki-67 (índice de proliferação)					
Baixo grau	132	28,9	60	48,8	0,001
Alto grau	325	71,1	63	51,2	
Molecular					
Luminal A	111	24,3	33	26,8	0,758
Luminal B HER-2 negativo	216	47,3	49	39,8	
Luminal B HER- 2 positivo	64	14,0	22	17,9	
HER-2 hiperexpresso	26	5,6	9	7,3	
Tripla negativo	40	8,8	10	8,1	
Cirurgia					
Não realizada	1	0,2	1	0,8	0,478
Setorectomia	181	39,6	51	41,5	
Mastectomia	275	60,2	71	57,7	
Quimioterapia					
Não realizada	117	25,6	16	13,0	0,000
Realizada	340	74,4	107	87,0	
Radioterapia					
Não realizada	168	36,8	29	23,6	0,000
Realizada	289	63,2	94	76,4	
Hormonioterapia					
Não realizada	89	19,5	23	18,7	0,800
Realizada	368	80,5	100	81,3	
Herceptin® (alvo anti-HER-2)					
Não realizado	41	45,6	21	70,0	0,154
Realizado	49	54,4	9	30,0	

	Coorte total		Coorte SIRT-1		P*
	n=457	%	n=123	%	
Censuras					
Vivos	364	79,6	87	70,7	0,004
Óbitos	93	20,4	36	29,3	

Fonte: O autor (2016)

* Significância estatística

Para análise e quantificação do grau da expressão nuclear da SIRT-1, através da técnica de imuno-histoquímica e por reação de imunofluorescência, foram adotados os seguintes critérios de classificação:

Expressão negativa (0): grau de expressão nuclear da SIRT-1 ausente ou reação imunofluorescente positiva ao anticorpo anti-SIRT-1 em até 1% das células tumorais;

Expressão fraca (1+): grau de expressão nuclear da SIRT-1 positiva entre 1 a 49% das células tumorais (Figura 29);

Expressão moderada (2+): grau de expressão nuclear da SIRT-1 positiva entre 50 a 79% das células tumorais (Figura 30);

Expressão forte (3+): grau de expressão nuclear da SIRT-1 positiva acima de 80% das células tumorais (Figuras 31 e 32).

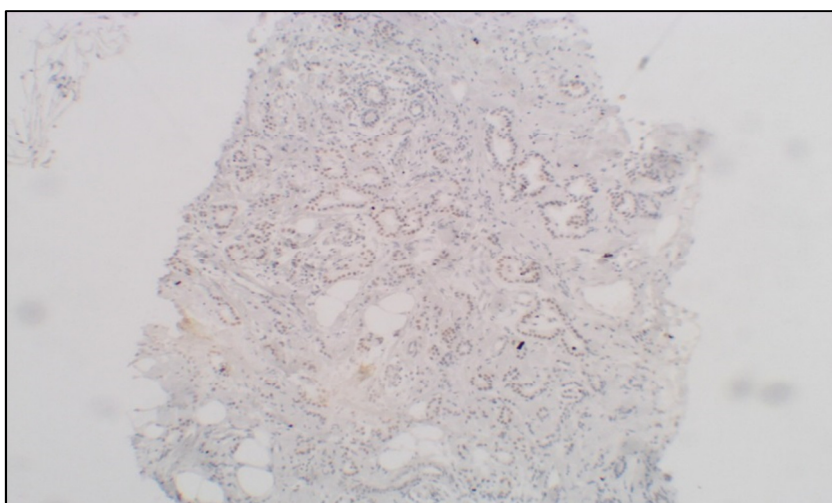


Figura 29 – Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão fraca da SIRT-1 (grau de expressão de 40%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.

Fonte: O autor (2016)

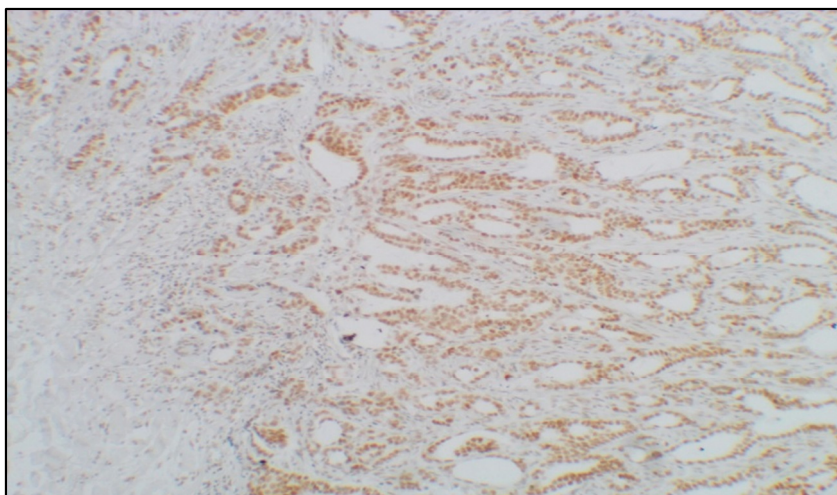


Figura 30 - Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão moderada da SIRT-1 (grau de expressão de 70%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.

Fonte: O autor (2016)

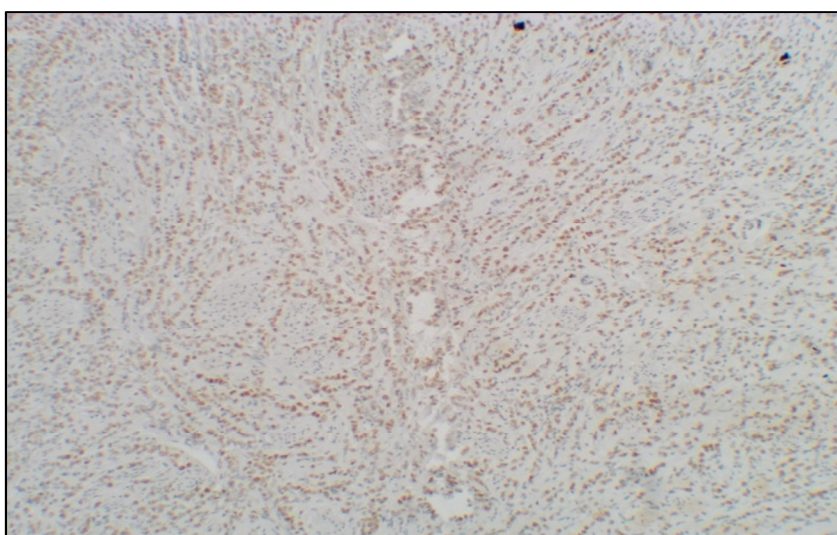


Figura 31 - Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão forte da SIRT-1 (grau de expressão de 80%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.

Fonte: O autor (2016)

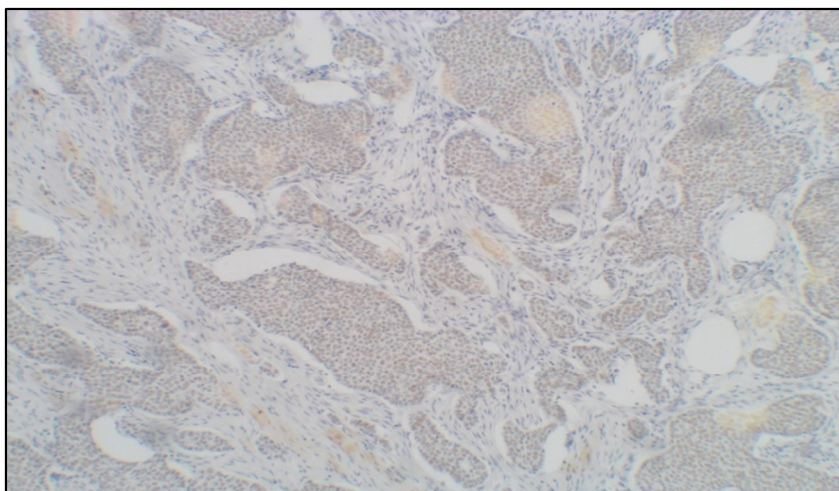


Figura 32 - Imagem microscópica de tecido tumoral de carcinoma mamário em paciente feminina com expressão forte da SIRT-1 (grau de expressão de 90%). Técnica imuno-histoquímica. Aumento 100x.

Fonte: O autor (2016)

A Tabela 4 apresenta a descrição dos casos classificados de acordo com o grau de expressão da SIRT-1, encontrada a partir da investigação imuno-histoquímica e conforme critérios adotados para classificação. Nas análises do grau de expressão da SIRT-1, observamos 9 casos (7,3%) que não apresentaram expressão; 71 casos (57,7%) classificados como expressão fraca; 35 casos (28,5%) classificados como expressão moderada e 8 casos (6,5%) classificados como expressão forte.

Tabela 4 - Descrição do grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) em pacientes portadoras de câncer de mama e número de eventos (mortes) ocorridos durante o seguimento

Grau de expressão SIRT-1	Total N=123		Eventos (mortes) N=35	
		%		%
Expressão negativa (0)	9	7,3	3	33,3
Expressão fraca (1+)	71	57,7	18	25,4
Expressão moderada (2+)	35	28,5	9	25,7
Expressão forte (3+)	8	6,5	5	62,5

Fonte: O autor (2016)

De acordo com o objetivo principal proposto nesta pesquisa foram calculadas as estimativas medianas de sobrevida e risco de morte, nos modelos univariado e multivariado de Cox, para verificar o impacto do perfil hiperexpressão de SIRT-1 no prognóstico das pacientes investigadas. Para modelagem destas análises, as

pacientes foram agrupadas e classificadas em dois grupos, de acordo com a hiperexpressão ou não da SIRT-1.

Desta forma, os grupos foram classificados em:

- Grupo Sirtuína-1 (SIRT-1) negativa: foram considerados os casos das pacientes que apresentaram expressão negativa(0), expressão fraca(1+) e expressão moderada (2+) de SIRT-1;

- Grupo Sirtuína-1 (SIRT-1) hiperexpressa: foram consideradas as pacientes que apresentaram expressão forte(3+).

As curvas de sobrevida global doença específica, estimadas para as 123 pacientes portadoras de câncer de mama, em relação ao perfil da expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) investigados por imuno-histoquímica, estão apresentadas na Figura 33. De acordo com as análises e critérios adotados nesta pesquisa, observamos 115 casos (93,5%) que apresentaram expressão negativa da Sirtuína-1 (SIRT-1), tendo ocorrido 30 mortes neste grupo, representando 26,1% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a expressão negativa da Sirtuína-1 (SIRT-1), foi de 115,541 meses (IC 95% 107,324 a 123,758). A hiperexpressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) foi observada em 8 casos (6,50%), tendo ocorrido 5 mortes neste grupo, representando 62,5% dos casos. A mediana da sobrevida global doença específica, estimada para as pacientes com a hiperexpressão da Sirtuína-1 (SIRT-1), foi de 74,221 meses (IC 95% 47,735 a 100,707). O teste de *log-rank* global rejeitou a hipótese de semelhança (paralelismos) entre as curvas de distribuições de sobrevida (X^2 : 4,452; $p=0,035$). Assim, as curvas de sobrevida, estratificadas de acordo com o perfil de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) nas pacientes portadoras de câncer de mama, demonstraram que há diferença significativa entre elas ($p<0,05$).

Os *Hazard Ratio* (HR) foram calculados, pelo modelo univariado, para o perfil imuno-histoquímico da expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1), tendo como referência as pacientes classificadas com expressão negativa da Sirtuína-1 (SIRT-1). As pacientes classificadas com hiperexpressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) apresentaram HR de 2,66 (IC 95% 1,03-6,86; $p=0,043$) (Tabela 2).

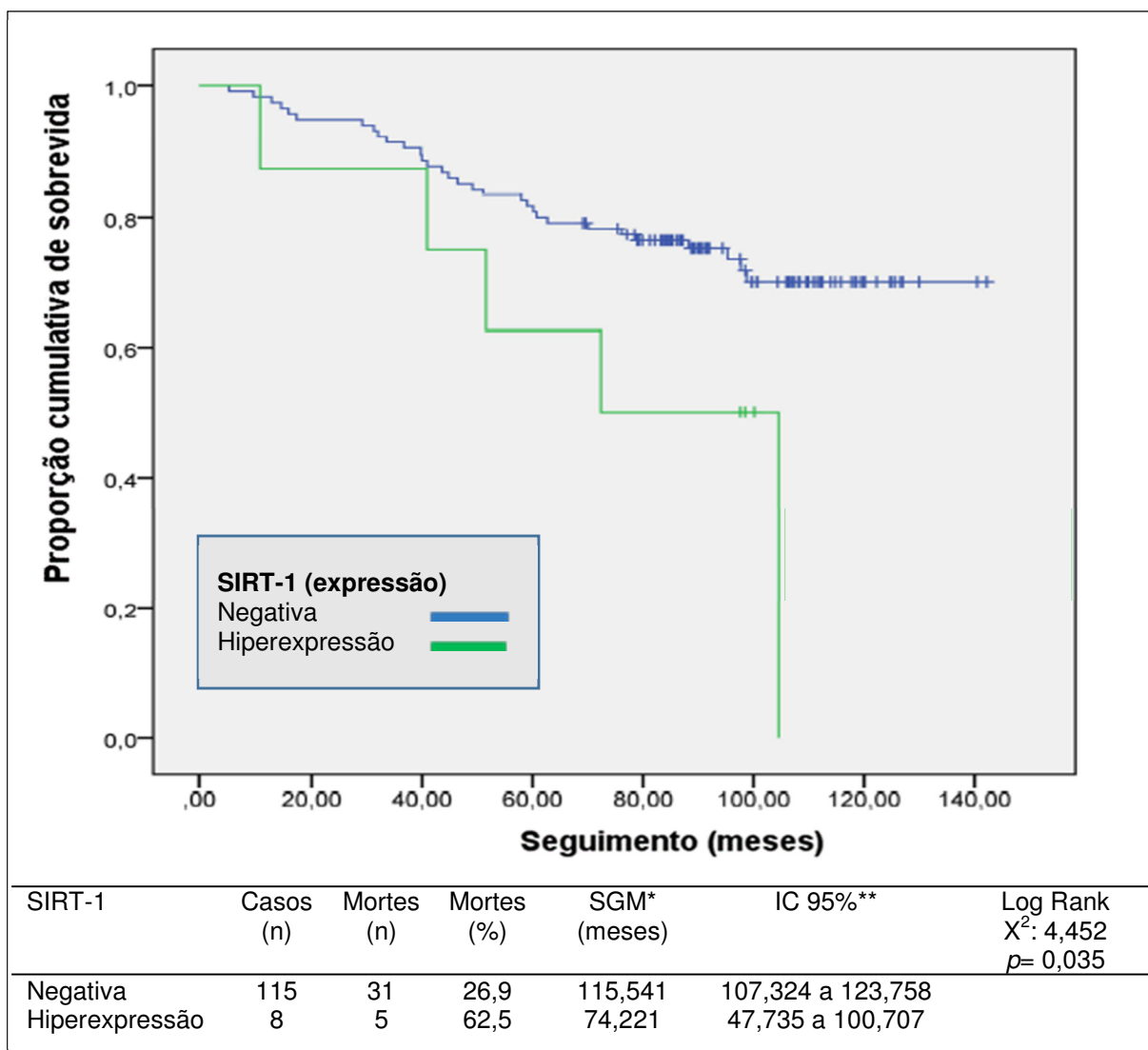


Figura 33 - Curvas de sobrevida global doença específica (Kaplan-Meier) em meses da coorte de pacientes portadoras de câncer de mama de acordo com expressão de Sirtuína-1 (SIRT-1)

Fonte: O autor (2016)

* SGM: estimativa de sobrevida mediana a cada tempo.

** IC: intervalo de confiança.

As pacientes que apresentaram hiperexpressão de SIRT-1 representaram 6,5% da amostra investigada. As características gerais desta amostra de acordo com as variáveis pesquisadas estão descritas, a seguir:

- A idade mediana foi de 58 anos, sendo que a mais jovem tinha 35 anos e a mais velha 77 anos.

- O tipo histológico identificado em todos os casos foi o carcinoma ductal invasor.

- O tamanho do tumor foi classificado como T2 (2cm a 4,9cm) em quatro casos (50%) e T3 (> 5,0cm) em 4 casos (50%).

- O comprometimento metastático em linfonodos axilares foi evidenciado em quatro casos (50%) e quatro casos (50%) apresentaram a axila livre de comprometimento.

- Quanto ao estadiamento clínico (TNM), identificamos três pacientes (37,5%) com estágio II (doença limitada) e cinco pacientes (62,5%) com estágio III (avançado).

- O grau histológico foi classificado como alto em cinco casos (62,5%) e intermediário em três casos (37,5%).

- O perfil de expressão dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) foi negativo em quatro casos (50%) e positivo em quatro pacientes (50%). Não houve diferença específica na análise individual dos receptores de estrogênio e progesterona.

- O índice de proliferação celular (ki-67) foi de alto grau em sete pacientes (87,5%) e identificamos um caso (12,5%) de baixo grau.

- O perfil Her-2 foi negativo em cinco casos (62,5%) e hiperexpresso em três casos (37,5%).

- Quanto a classificação de acordo com o perfil molecular, identificamos um caso (12,5%) categorizado como Luminal A, três casos (37,5%) categorizados como Luminal B Her-2 negativo, dois casos (25%) categorizados como Her-2 Hiperexpresso e dois casos (25%) categorizados como Triplo negativo.

- Quanto ao tipo de tratamento cirúrgico empregado, observamos que cinco pacientes (62,5%) realizaram mastectomia e três pacientes (37,5%) foram submetidas à cirurgia conservadora.

- A quimioterapia e radioterapia foram empregadas em todos os casos.

- A hormonioterapia foi realizada em cinco pacientes (50%).

- A terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin® foi realizada em um caso (50%).

Com o objetivo de verificar o efeito prognóstico do grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1), de acordo com o risco de morte por câncer de mama, foram calculados os *Hazard ratio* (HR) para a SIRT-1 ajustadas pelas variáveis selecionadas. A Tabela 5 apresenta a descrição das variáveis e os respectivos

hazard ratios (HR) obtido em cada análise pelo método univariado da regressão de Cox.

Tabela 5 - Análise Univariada da SIRT-1 ajustada para ocorrência de morte de acordo com a descrição de cada variável prognóstica na coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama

Variáveis ajustadas	HR*	IC 95%***	p***
SIRT-1 não ajustada	2,66	(1,03 – 6,86)	0,043
Idade	2,86	(1,11 – 7,38)	0,030
Histologia	2,79	(1,07 – 7,28)	0,036
Tamanho do tumor	1,92	(0,71 – 5,20)	0,198
Linfonodos	2,73	(1,06 – 7,04)	0,037
TNM	2,25	(0,87 – 5,81)	0,096
Grau	1,87	(0,71 -4,92)	0,206
Her-2	2,82	(1,07 -7,44)	0,036
Ki – 67	2,48	(0,95-6,42)	0,062
Receptor estrogênio	2,42	(0,89 - 6,60)	0,085
Receptor progesterona	2,13	(0,79 – 5,73)	0,135
Perfil Molecular	2,47	(0,93 – 6,59)	0,071
Cirurgia	2,57	(1,00 - 6,62)	0,051
Quimioterapia	2,90	(1,11 – 7,60)	0,030
Radioterapia	2,71	(1,05 – 7,01)	0,040
Hormonioterapia	2,18	(0,79 – 6,04)	0,134
Herceptin®	2,53	(0,98 – 6,54)	0,055

Fonte: O autor (2016)

* *Hazard Ratio* (HR) obtido pelo modelo de riscos proporcionais de Cox ajustados para cada variável

** Intervalo de confiança

*** Significância estatística

As variáveis prognósticas que apresentaram significância no modelo univariado e, que apresentam relevância na patogenia da SIRT-1, foram selecionadas para elaboração dos modelos regressivos multivariados, pelo método de Cox. As variáveis selecionadas foram a idade, os linfonodos axilares, a classificação TNM, o grau histológico, o perfil Her-2, o índice de proliferação celular ki-67, o perfil dos receptores hormonais e o perfil de acordo com a classificação molecular. A Tabela 6 apresenta a descrição dos modelos submetidos à análise multivariada da expressão de SIRT-1, ajustados de acordo com cada grupo de variáveis selecionadas.

Tabela 6 - Análise Multivariada da SIRT-1 ajustada para ocorrência de morte de acordo com as variáveis prognósticas agrupadas em modelos específicos na coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama

Modelos	HR*	IC 95%***	<i>p</i> ***
SIRT-1 não ajustada	2,66	(1,03 – 6,86)	0,043
SIRT-1, Idade	2,86	(1,11 – 7,38)	0,030
SIRT-1, Idade, Linfonodos	3,58	(1,35 – 9,52)	0,011
SIRT-1, Idade, TNM, Grau histológico	2,27	(0,84 – 6,15)	0,108
SIRT-1, Idade, Linfonodos, Her-2, ki-67	3,82	(1,37–10,64)	0,010
SIRT-1, Idade, Linfonodos, Receptor hormonal	2,87	(0,97 – 8,48)	0,056
SIRT-1, Idade, Linfonodos, Perfil molecular	3,44	(1,21 – 9,79)	0,021

Fonte: O autor (2016)

* Hazard Ratio (HR) obtido pelo modelo de riscos proporcionais de Cox ajustados para cada modelo proposto

** Intervalo de confiança

*** Significância estatística

A SIRT-1 apresentou associação prognóstica com maior risco de morte por câncer de mama, significativa e independente, em quase todos os modelos multivariados propostos. Somente não houve associação com pior prognóstico, no modelo que testou a SIRT-1, a idade, a classificação TNM e o grau histológico tumoral, e no modelo que testou a SIRT-1, a idade, os linfonodos axilares e os receptores hormonais.

8 DISCUSSÃO

O câncer de mama caracteriza-se por ser uma doença complexa e heterogênea com diversos fatores envolvidos na sua etiologia e no seu prognóstico (POLYAK, 2007). Os fatores prognósticos podem ter variações, de acordo com a população estudada, devido às diferenças da região demográfica investigada, das condições de acesso aos programas de rastreamento e da qualidade do tratamento oferecido, acarretando, portanto, desfechos prognósticos distintos para cada grupo populacional. Neste cenário, há diferenças em relação à sobrevida e prognóstico, no câncer de mama, que são observados em diversos países e atribuídas às diferenças na qualidade de tratamento oncológico oferecido às pacientes, sendo que menores sobrevidas são verificadas para as pacientes de países com menores índices de desenvolvimento socioeconômico (ALLEMANI et al., 2015).

Nos Estados Unidos, o câncer de mama é o segundo câncer mais letal, sendo responsável por 40.000 mortes por ano (SIU, 2016) e, apesar dos avanços obtidos no diagnóstico precoce e na terapêutica do câncer, a qualidade e o resultado dos tratamentos também apresentam diferenças, com muitas disparidades dependentes de fatores como a idade, raça, local geográfico e o Centro Hospitalar em que o tratamento foi realizado (PETKOV et al., 2016).

Os estudos populacionais de coorte em câncer de mama são fundamentais para conhecer os dados epidemiológicos regionais e entender o comportamento e desfechos destas populações diante da doença. A pesquisa de um marcador biológico molecular com relevância no prognóstico do câncer de mama é importante para contribuir para a adoção de estratégias adequadas, visando ao enfrentamento desta doença. Este foi o primeiro estudo de sobrevida em câncer de mama realizado na cidade de Erechim e região Alto Uruguai, no Estado do Rio Grande do Sul e com objetivo de investigar o impacto de um novo marcador biológico molecular no prognóstico desta doença.

O tempo de seguimento mediano da coorte estudada representa o tempo em que 50% das pacientes que compuseram a coorte foram acompanhadas. O tempo

mediano de seguimento encontrado na coorte estudada foi de 61,93 meses, que representa um tempo adequado de acompanhamento para análise do desfecho de interesse, no caso óbito por câncer de mama.

A estimativa mediana de sobrevida geral câncer específica encontrada na coorte foi de 120,2 meses sendo que as estimativas de sobrevida medianas em 5 anos e 10 anos foram estimadas em 79,6% e 69,1%, respectivamente. Já, o tempo de sobrevida mediano da coorte foi indeterminado, pois até o final do seguimento não ocorreram 50% de eventos (mortes) nas pacientes acompanhadas. Estes dados encontrados na coorte estudada são relevantes, pois, independente da análise de subgrupos, estágios ou variáveis específicas, eles demonstraram estimativas de sobrevida de uma população específica do interior do Rio Grande do Sul. Estes resultados podem ser comparados às taxas de sobrevida encontradas em outras regiões do Brasil e em outros países, avaliando, desta forma, a qualidade de saúde prestada nesta região. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas de sobrevida em 5 anos para câncer de mama avançados são de 55 a 60% (BRASIL, 2016). Nos Estados Unidos, o câncer de mama, em estágio inicial, apresentava estimativas de sobrevida em 5 anos, entre 65 e 92%, e em estágio avançado, entre 14 e 47% (TANEJA et al., 2010). Um recente estudo de base populacional de duas coortes holandesas, entre 1999-2005 e 2006-2012, com tempo mediano de seguimento de 9,8 anos, estimou sobrevida em 5 anos de 91% e 96%, respectivamente em cada período, para as mulheres portadoras de câncer de mama.

Anualmente, a *American Cancer Society*, estima o número de novos casos de câncer e de mortes que ocorrerão nos Estados Unidos e, compila o dados mais recentes sobre incidência, mortalidade e sobrevida. Em 2016, publicou que, a sobrevida global para o câncer de mama, em 5 anos, nos períodos de 1975-1977, 1987-1989 e 2005-2011, foram 75%, 84% e 91%, respectivamente. Nas últimas duas décadas, verificou-se uma redução de 36% no número de mortes por câncer de mama nos Estados Unidos (SEIGEL, MILLER, JEMAL, 2016). O estudo CONCORD-2, publicado em março de 2015, analisou registros populacionais de câncer em 67 países, no período de 2005-2009, e verificou grande disparidade de sobrevida em 5 anos para os mais diversos tipos de câncer, dentre eles, o câncer de mama. Os países desenvolvidos estimaram sobrevida em 5 anos para o câncer de

mama de, aproximadamente, 80% ou mais, sendo que em países como Mongólia, Índia, Malásia e África do Sul, as estimativas foram de 68%, 60%, 57% e 53%, respectivamente. Na América Central e do Sul, observou-se uma elevação de sobrevida no período de 2005-2009 quando comparados ao período de 1995-1999, principalmente no Brasil (de 78% para 87%), Colômbia (de 66% para 76%) e Equador (de 69% para 83%) (ALLEMANI et al., 2015). Desta forma, os resultados encontrados nesta pesquisa, realizada em Erechim-RS, demonstram taxas alinhadas para o Brasil, de acordo com o estudo CONCORD-2, porém, com necessidade de interpretar criticamente os resultados obtidos para avaliar a qualidade do diagnóstico e o atendimento oferecido às pacientes portadoras de câncer de mama. Assim, será possível identificar possíveis deficiências, propor alternativas e reconhecer a necessidade de mudanças para melhorar a qualidade da assistência em saúde e, conseqüentemente, melhorar as estimativas de sobrevida para os próximos anos.

A idade mediana, do diagnóstico de câncer de mama na coorte estudada, foi de 57,4 anos sendo que a idade mínima foi de 25 anos e a máxima de 92 anos. Analisando o histograma da distribuição das idades e a distribuição dos casos nas diferentes faixas etárias, observamos uma característica do câncer de mama, que é o de acometer em todas as faixas etárias. O diagnóstico de câncer de mama em mulheres abaixo de 50 anos representou 32,6% do total de casos e, em mulheres, acima dos 60 anos foram 42,2% do total de casos da coorte pesquisada. Classicamente, o câncer de mama está relacionado ao envelhecimento e apresenta um risco de incidência de três vezes maior nas mulheres acima dos 70 anos (SPARANO, MUSS, 2016). A distribuição dos casos encontrados nesta pesquisa apresentaram uma frequência de diagnósticos equivalentes para todas as faixas etárias. Estes dados demonstram a importância e necessidade de discutir as ações relativas ao rastreamento e diagnóstico precoce do câncer de mama às mulheres jovens, abaixo de 50 anos, e para as mulheres pós menopausa e longevas, acima dos 70 anos.

Apesar do incentivo em campanhas públicas para a realização do diagnóstico precoce através do exame de mamografia, com finalidade de rastreamento (*screening*) e da redução das taxas de mortalidade por câncer de mama em até 20% com esta ação, esse tema ainda é motivo de discordâncias na literatura e em

organizações que estudam as ações preventivas no câncer (MYERS et al., 2015). Esse fato corrobora com a necessidade e importância da realização de estudos e pesquisas em populações regionais e específicas para que seja possível identificar o perfil epidemiológico e entender a forma de apresentação da doença. Assim, será possível adotar as melhores estratégias para o seu enfrentamento, adequando as ações conforme a faixa etária envolvida.

Nos Estados Unidos, o câncer de mama é mais frequentemente diagnosticado em mulheres entre 55 e 64 anos, com idade mediana de 62 anos para o diagnóstico do câncer de mama (SIU, 2016). Nesse contexto, nos Estados Unidos, a recomendação para realização de mamografia para rastreamento precoce de câncer de mama (*screening*) na população feminina, vem sendo modificada nos últimos anos, e está sendo recomendada para as mulheres em idades entre 50 e 74 anos. A recomendação de mamografia de rastreamento para mulheres assintomáticas entre os 40 anos e 50 anos, que vigorava no passado, agora segundo as novas recomendações, deverão ser realizadas analisando individualmente cada caso e, também, de acordo com os riscos específicos envolvidos (SIU, 2016). Com base na coorte de Erechim.RS, observamos que a idade mediana do diagnóstico foi de 10 anos a menos em relação à mediana de idade encontrada no estudo realizado na população norte americana. Este dado tem relevância e nos remete a discutir a viabilidade de iniciar o rastreamento com mamografia na população feminina assintomática do Rio Grande do Sul, em um período de pelo menos 10 anos antes do que a recomendada nos Estados Unidos, ou seja, iniciar o rastreamento (*screening*) aos 40 anos de idade. Além disto, na coorte pesquisada foram encontradas 22,5% dos casos de câncer de mama com idade igual ou superior a 70 anos, caracterizando um grupo importante de pacientes que requerem atenção, já que no Rio Grande do Sul temos uma população idosa e longeva. Um estudo populacional recentemente publicado, com dados relevantes dos Estados Unidos, também demonstraram uma maior frequência de novos diagnósticos de câncer de mama em faixas etárias mais velhas, requerendo atenção específica neste aspecto (ROSENSTOCK et al., 2016). No Brasil, estima-se que aproximadamente 10% das mulheres alvo para programas de rastreamento estejam sendo submetidas ao exame de mamografia (LEE et al., 2012). Estudo recente, publicado no *New England Journal*, que avaliou dados epidemiológicos de 1975 a 2012 de mulheres norte americanas acima de 40 anos com câncer de mama,

revelou um aumento na detecção de tumores menores que 2 cm de 36% para 60% e redução de diagnósticos de tumores maiores que 2 cm, de 64% para 32%. Porém, apesar da eficiência da mamografia de rastreamento, os pesquisadores consideraram que, ocorreu um sobrediagnóstico estimado em 132 casos por 100 mil mulheres, ou seja, casos diagnosticados por rastreamento que nunca teriam evoluído com sintomatologia clínica (WELCH et al., 2016).

Verificando as curvas de estimativas de sobrevida, relacionadas à variável idade, na coorte de Erechim-RS, observamos uma associação prognóstica estatisticamente significativa de pior sobrevida às pacientes mais velhas. De acordo com as faixas etárias analisadas, observamos que as pacientes, com idades entre 60 e 69 anos e, as pacientes, com idade acima de 70 anos, apresentaram um maior número de mortes por câncer de mama, 23,3% e 34,0%, respectivamente. A estimativa mediana de sobrevida doença global específica deste grupo de pacientes, foi, estatisticamente, inferior à sobrevida das pacientes com idades inferiores a 50 anos. As pacientes com idades inferiores a 50 anos, apresentaram um menor número de mortes, que representou, 14,9% dos casos. Essa característica, de menor sobrevida para as faixas etárias mais velhas, foi demonstrada, nas estimativas e curvas de sobrevidas, investigadas neste estudo. No Brasil, as mortes por câncer de mama apresentaram um crescimento anual, sendo que em 2012 foram identificadas 13.746 mortes. Uma análise brasileira referente ao ano de 2010, em que ocorreram 12.853 mortes, foram observadas 25,7% das mortes na faixa etária abaixo de 49 anos, 24,5 % das mortes entre 50 e 59 anos, 21 % entre 60 e 69 anos e 28,1% na faixa etária acima de 70 anos (CECÍLIO et al., 2015).

Analisando os resultados apresentados, no modelo univariado, observamos um risco proporcional de mortes significativamente mais elevado para as mulheres com faixas etárias superiores a 60 anos. As mulheres com idades entre 60 e 69 anos apresentaram um risco de morte 1,88 vezes maior que as pacientes com idades inferiores a 50 anos e as mulheres com idade igual ou superior a 70 anos apresentaram um risco de 2,92 vezes maior em relação às mulheres com idades inferiores a 50 anos. Estes dados, obtidos na pesquisa, revelam uma diferença estatisticamente significativa e desfavorável no prognóstico das mulheres com idades superiores a 60 anos, quando comparadas a faixas etárias menores. Assim, algumas observações, são importantes para justificar esses achados:

- As mulheres idosas tem diagnosticado o câncer de mama em estágios mais avançados;

- Ocorre retardo no acesso para rastreamento (*screening*) das mulheres assintomáticas nestas idades. Apesar, de alguns estudos, demonstrar evidências de benefício na redução da mortalidade, por câncer de mama, pelo rastreamento mamográfico em pacientes com 74 anos, a maioria dos estudos, ainda, são inconclusivos (SANDERSON et al., 2015). O benefício da recomendação para realização ou não, da mamografia, para pacientes acima dos 70 anos, e, especialmente, em pacientes longevas, com idades superiores a 80 anos, ainda não está definido (MASSIMINO et al., 2016).

- As estratégias de tratamentos menos eficazes, para o câncer de mama, estão sendo oferecidas e utilizadas para este grupo etário de pacientes. Corroborando com esta observação, um estudo também retrospectivo, realizado em um Hospital Universitário da Alemanha, evidenciou menor estimativa de sobrevida em pacientes portadoras de câncer de mama, acima de 65 anos, quando comparados à estimativa de sobrevida de pacientes mais jovens tratadas no mesmo Hospital. As análises sugerem menor realização de quimioterapia para o grupo de pacientes acima de 65 anos (WALLWIENER et al., 2016).

- As doenças crônicas não infecciosas (comorbidades), que são mais prevalentes em faixas etárias mais velhas, contribuem para a diminuição da capacidade e performance global das pacientes, e concorrem para o aumento dos riscos de complicações clínicas. Desta forma, as comorbidades, tornam-se importantes para a seleção de estratégias terapêuticas e, podem ser a justificativa para a redução da utilização de tratamentos oncológicos, como a quimioterapia ou terapias alvo específicas, alterando assim, o desfecho e o prognóstico para esse grupo de pacientes (ROSENSTOCK et al., 2016). As comorbidades clínicas são, potencialmente, um viés de difícil controle e que podem contribuir no perfil dos achados para essas análises estatísticas retrospectivas.

De acordo com o comportamento biológico do tumor em relação à idade, classicamente observamos uma evolução menos agressiva para tumores em idades mais avançadas quando comparados aos que ocorrem em pacientes jovens. Um recente estudo genômico demonstrou que o câncer de mama, em pacientes jovens, está associado com uma maior expressão de genes relacionados à proliferação, células tronco e resistência endócrina, enquanto que o câncer de mama em idosos,

especialmente, o carcinoma ductal, apresentaria mais expressão de mutações somáticas (AZIM Jr et al., 2015). Alguns estudos demonstraram a associação de menor sobrevida e pior prognóstico, nas pacientes jovens, devido à ocorrência de tumores com perfil molecular mais agressivo, nesta faixa etária, como o câncer de mama com perfil Triplo negativo (LIEDTKE et al., 2015). As evidências, com base em estudos retrospectivos, sugerem que o fenótipo molecular e patológico dos tumores são diferentes nas mulheres jovens em relação às mais idosas, com comportamentos prognósticos diferentes, requerendo abordagens distintas (SABIANI et al., 2016). Ficou demonstrado, na coorte estudada em Erechim, que há necessidade de atenção e cuidados específicos às faixas etárias mais elevadas, pois apresentaram, significativamente, menor estimativa de sobrevida e maior risco de morte, por câncer de mama, em relação às pacientes mais jovens. As razões destas evidências, identificadas na pesquisa, podem estar relacionadas à pior qualidade no cuidado oferecido para este grupo de pacientes ou, a um comportamento biológico mais agressivo, o que contrapõe muitas evidências da literatura. Assim, evidencia-se que a população idosa portadora de câncer de mama é heterogênea e, portanto, o cuidado não deve ser centrado apenas na idade cronológica (BIGANZOLI et al., 2012). O Consenso de St Gallen recomenda que não se deve estabelecer um limite absoluto de idade para a utilização da quimioterapia no tratamento oncológico das pacientes idosas (COATES et al., 2015).

Na coorte estudada em Erechim, quanto à histologia tumoral, houve amplo predomínio do carcinoma ductal invasor, que representou 86,9% dos casos. Além desta histologia, foi identificado nas pacientes, 10,5% de casos com histologia carcinoma lobular invasor e 2,6% de casos de carcinomas mucinosos. As histologias encontradas no estudo são as mais frequentemente citadas na literatura e suas descrições estão de acordo com critérios de classificação histológicas do câncer de mama (HANS-PETER, HANS K., 2013). As análises de estimativa de sobrevida e os cálculos de risco de morte, no modelo univariado, relacionadas aos tipos histológicos de câncer de mama encontrados na coorte estudada, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre as histologias encontradas. Observamos, nesta pesquisa, que não houve correlação significativa entre as histologias do tipo carcinoma ductal invasor e carcinoma lobular invasor, apesar de uma tendência de risco de morte maior para o carcinoma lobular. Corroborando, com os achados desta pesquisa, um estudo Espanhol publicado em 2015, analisou as características

histopatológicas e imuno-histoquímicas de 1745 pacientes submetidas à tratamento cirúrgico por câncer de mama, com seguimento de 76 meses, também não demonstrou diferença entre os tipos histológicos quanto à recorrência local, ocorrência de metástases à distância ou mortalidade. Neste estudo espanhol, o carcinoma lobular invasor representou, 9% dos casos, e o carcinoma ductal invasor, 91% dos casos (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2015).

O carcinoma tipo mucinoso da mama é menos frequente, em geral representa 4% do total de casos de cânceres invasivos, e tem sido relacionado com melhor prognóstico (LEI et al, 2016). Na coorte estudada, não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao prognóstico quando comparado às histologias carcinoma do tipo ductal invasor e carcinoma lobular invasor e, apesar de apresentar uma tendência de risco protetor (HR=0,54) em relação a histologia carcinoma do tipo ductal invasor, não houve significância estatística.

Classicamente, o tratamento e prognóstico do câncer de mama é baseado em fatores histológicos relacionados ao tamanho do tumor, comprometimento metastático dos linfonodos axilares e a presença ou não de metástases à distância (TANEJA et al., 2010; CHEN et al, 2014). O agrupamento destes fatores histológicos permite classificar os tumores em estágio inicial, intermediário ou avançado, contribuindo para a determinação do tipo de tratamento oncológico que deverá ser empregado, e estimar a sobrevida para os pacientes de acordo com o estágio verificado no momento do diagnóstico. A classificação padronizada, que melhor prediz o prognóstico, adotada internacionalmente, é a classificação dos tumores malignos estratificada pelo sistema TNM (AJCC) (GREENE et al., 2002), que agrupa os tumores em Estágios I, II, III e IV de acordo com a sua extensão (SENKUS et al., 2015). As estimativas de sobrevida em 5 anos, para pacientes com câncer de mama, no estágio I é de 92%, no estágio II, de 65 a 82%, no estágio III de 44 a 47% e no estágio IV (metastático) é de 14% (TANEJA et al., 2010).

No nosso estudo, verificando os resultados obtidos, podemos observar que a análise da variável, tamanho do tumor (T), foi um fator prognóstico, estatisticamente significativo para estimar a sobrevida e o risco de morte das pacientes portadoras de câncer de mama. Observamos que, somente 28,7% dos casos tinham tumores pequenos, menores que 2cm (T1), e os demais casos, que corresponde a 71,3%, apresentavam-se ao diagnóstico com tumores maiores (T2 e T3) e inflamatórios

(T4). O número de mortes ocorridas em pacientes com tumores maiores que 5 cm (T3) ou tumores inflamatórios (T4), durante o tempo de seguimento da coorte, foi de 41,2% e 40,7% dos casos, respectivamente. A estimativa de sobrevida de acordo com o tamanho tumoral verificada na coorte foi inversamente proporcional ao seu tamanho. Quanto ao risco de morte das pacientes, de acordo com o tamanho tumoral, e assumindo como referência, os tumores pequenos (T1), o risco foi significativamente maior para os tumores classificados em T2, T3 e T4. As pacientes classificadas com tumores T2 (2-4,9cm), apresentaram um risco de morte quase duas vezes maior; os tumores T3 (≥ 5 cm), apresentaram um risco de morte quase 4 vezes maior e, os tumores T4 (inflamatórios), apresentaram um risco de morte 5 vezes maior em relação aos tumores iniciais. Estes dados obtidos na pesquisa demonstram que, para a maioria das pacientes, o diagnóstico inicial foi realizado quando o tumor apresentava-se com tamanho maior que 2 cm, portanto, mais avançado, e possivelmente, palpável ao toque digital. Nestes casos, a possibilidade de ter uma sobrevida menor é esperada e, conseqüentemente, com risco maior de morte. Já, quando o diagnóstico é realizado por mamografia de rastreamento, os tumores poderão estar impalpáveis ao exame clínico das mamas e, portanto, diagnosticados com tamanhos menores, podendo obter uma sobrevida, após tratamento, significativamente maior. Estes achados investigados e descritos na coorte de Erechim-RS, demonstram a necessidade de diagnosticar precocemente o câncer de mama, além do fato de identificar possíveis fragilidades nos programas de rastreamento feminino relacionadas ao câncer de mama, na região.

Da mesma forma, que a análise do tamanho tumoral foi significativa, estatisticamente, para estimar a sobrevida das pacientes portadoras de câncer, o perfil de comprometimento dos linfonodos axilares demonstrou relevância na coorte estudada. Corroborando com dados da literatura, o status de comprometimento metastático axilar, além de determinar um estágio mais avançado do câncer de mama, prediz uma menor sobrevida (COATES et al., 2015; SENKUS et al., 2015). Na coorte pesquisada, verificamos que 50,8% das pacientes apresentavam, no momento do diagnóstico, comprometimento metastático axilar, tendo ocorrido mais de 30% de mortes neste grupo de pacientes durante o seguimento da coorte. Neste grupo de pacientes a sobrevida mediana estimada foi significativamente menor em relação ao grupo das pacientes que não apresentaram envolvimento metastático axilar no momento do diagnóstico de câncer de mama. As pacientes que não

apresentaram comprometimento axilar, ou seja, ausência de envolvimento metastático no momento do diagnóstico, evoluíram para uma estimativa de sobrevida maior. Neste grupo de pacientes com axila negativa (N0), o número de mortes foram significativamente menor durante o tempo de seguimento da coorte, e o risco de morte, para as pacientes com axila positiva, foi de 1,6 vezes maior para as pacientes que apresentaram comprometimento de até 4 linfonodos (N1) e de 2,4 vezes maior para as pacientes com mais de 4 linfonodos comprometidos na axila (N2). As pacientes com comprometimento metastático mais extenso na axila, isto é, mais de 10 linfonodos ou linfonodos fusionados, apresentaram um risco de morte três vezes maior quando comparadas às pacientes que não apresentaram metástases na axila.

As informações obtidas nesta pesquisa, quanto à análise do tamanho tumoral e do status de comprometimento dos linfonodos axilares, demonstraram que aproximadamente metade das pacientes portadoras de câncer de mama foram diagnosticadas em estágios avançados, decorrentes de tumores maiores que 2 cm e também por envolvimento metastático nos linfonodos axilares. Estes achados, da pesquisa, indicaram um pior prognóstico para este grupo de pacientes e sinalizam a necessidade de diagnósticos em estágios mais precoces, através de programas organizados de rastreamento populacional. Neste contexto, confirma-se a estimativa de redução de mortalidade preconizada por alguns, autores e programas internacionais, que recomendam o rastreamento com mamografia para grupos específicos de mulheres visando ao diagnóstico do câncer de mama em estágios iniciais (MYERS et al., 2015).

O agrupamento das variáveis tamanho tumoral, status do comprometimento dos linfonodos axilares e a presença de metástases, através da classificação TNM (AJCC), em quatro estágios, demonstraram diferenças significativas entre eles, na estimativa de sobrevida e risco de morte das pacientes na coorte estudada. As pacientes que foram classificadas em Estágio I (doença inicial), pois tinham tumores menores que 2 cm e axila negativa, representaram 19,9% da amostra e apresentaram estimativa de sobrevida significativamente maior e um menor risco de morte do que as pacientes com estágios mais avançados. As pacientes com Estágio II (doença limitada) representaram 54,5% da amostra e apresentaram um risco de morte de 6,7 vezes maiores do que as pacientes em estágio I, e as pacientes

classificadas em Estágio III (doença avançada) que representaram 24,5% da amostra, apresentaram um risco maior de morte, de 15 vezes em relação ao Estágio I. Já, o Estágio IV (doença metastática) representou 1,1% da coorte, tendo todas as pacientes evoluído para o óbito durante o seguimento. O estudo epidemiológico *Amazona*, do Grupo Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama (GBECAN), investigou o câncer de mama no Brasil, identificou em torno de 20,2% das pacientes diagnosticadas em Estágio I, 46,8% em Estágio II, 24,6% em estágio III e 5,5% em Estágio IV (SIMON et al., 2009; LEE et al., 2012). O Brasil caracteriza-se por apresentar disparidades entre suas condições socioeconômicas e cuidados de saúde oferecidos à população, proporcionando, desta forma, diferenças importantes na apresentação do câncer de mama quanto ao estágio do diagnóstico. Neste estudo epidemiológico, anteriormente citado, verificou-se que, no norte do Brasil, 8,4% das mulheres foram diagnosticados com doença em estágio I e 46,2% foram diagnosticadas em estágios III e IV. Na região centro-oeste, foi verificado 12,3% de casos em estágio I, e 31,9% dos casos foram diagnosticados nos estágios III e IV. Na região Sul, foram identificados 24,7% de diagnósticos em estágio I e 25,1% em estágios III e IV (SIMON et al., 2009; LEE et al., 2012).

Os resultados obtidos no nosso estudo, em relação à classificação TNM (AJCC), identificou menor sobrevida e maior risco de morte por câncer de mama, para as pacientes que apresentaram, no momento do diagnóstico, estágios mais avançados da doença. Estes achados, são concordantes com resultados obtidos em diversos estudos da literatura (COATES et al., 2015; SENKUS et al., 2015). A avaliação prognóstica do câncer de mama, através da classificação TNM (AJCC), demonstra uma correlação significativa de pior prognóstico às pacientes com estágios avançados, porém, apesar de ser um sistema consagrado, é insuficiente para contemplar todos os fatores biológicos envolvidos na evolução desta doença, principalmente, para determinar o prognóstico aos estágios iniciais (SAADATMAND et al., 2015).

O grau histológico do câncer de mama é um parâmetro que avalia a diferenciação das células tumorais indicando o comportamento biológico do tumor e, conseqüentemente, a sua relação com os desfechos clínicos. O grau histológico de câncer de mama é determinado pelo Sistema de Classificação Nottingham (NGS), que é uma modificação do sistema de classificação Scarff-Bloom-Richardson

(ELSTON, ELLIS, 1991). Neste sistema de classificação, os tumores de baixo grau (Grau 1) representam um tumor bem diferenciado, que apresentam um padrão homólogo com a unidade lobular da mama normal, formação de túbulos (> 75%), um leve grau de pleomorfismo nuclear e baixa contagem mitótica. Os tumores de grau intermediário (Grau 2), representam um tumor moderadamente diferenciado e, os tumores de grau alto (Grau 3), indicam um tumor pouco diferenciado com um acentuado pleomorfismo celular e mitoses frequentes e nenhuma formação de túbulos (<10%) (RAKHA et al., 2010). O grau histológico foi investigado na coorte estudada e observamos um predomínio de pacientes classificadas com tumores de grau intermediário (65,8%) e tumores de alto grau (25,2%). Estes achados correlacionaram-se com pior prognóstico para as pacientes quando comparados aos tumores de baixo grau. As estimativas de sobrevida foram estatisticamente significativas e demonstraram que, quanto maior o grau tumoral identificado nas pacientes, menor a sobrevida estimada. O risco de morte verificados, de acordo com a variável grau histológico tumoral, demonstrou que, as pacientes com tumores de alto grau apresentaram um risco de morte de 6,7 vezes maior do que às pacientes com tumores de baixo grau. Estes dados estão de acordo com informações obtidas em grandes séries da literatura que confirmaram o grau histológico tumoral como uma ferramenta importante para predizer o comportamento biológico e a sua relação com o prognóstico nas pacientes com câncer de mama (RAKHA et al., 2010). Assim, o grau histológico se mantém como um importante fator biológico prognóstico na avaliação de risco do câncer de mama.

A análise da expressão dos receptores hormonais no câncer de mama e, o potencial bloqueio terapêutico desta via, foi um grande marco na história da oncologia mamária (COLE, JONES, TODD, 1971). A consolidação desta prática e o benefício da terapia endócrina, no desfecho das pacientes, tornaram mais seletivos os tratamentos para o câncer de mama (REINERT, BARRIOS, 2015; SESTAK et al., 2013; GOLDBIRSCH et al, 2013; COATES et al, 2015). Na coorte pesquisada, investigamos a expressão dos receptores hormonais e a realização da terapia endócrina antineoplásica para avaliar o impacto prognóstico, na sobrevida e risco de morte, para as pacientes portadoras de câncer de mama. Identificamos 376 casos (82,3%) de pacientes que expressaram positividade para receptores hormonais (RH), independente do subtipo de receptor, estrogênio (RE) ou progesterona (RP), e 81 pacientes (17,7%) não expressaram positividade para qualquer um dos

receptores de estrogênio ou progesterona. Durante o seguimento, ocorreram 70 mortes (18,6%) no grupo que expressou positividade para os receptores hormonais e 23 mortes (28,4%) no grupo com expressão negativa de receptores hormonais. As estimativas de sobrevida (Kaplan-Meier) demonstraram uma tendência de maior sobrevida e um menor risco de morte, na análise univariada (Cox), para as pacientes que expressaram receptores hormonais (RH) positivos. Alguns estudos investigaram a frequência de positividade da expressão dos receptores hormonais em pacientes portadoras de câncer de mama. Em uma investigação de 7.016 casos de câncer de mama, através de imuno-histoquímica em 71 laboratórios distintos, foram identificados 74 a 80% dos casos expressando positividade para receptores de estrogênio (RE) e 57 a 69% de expressão positiva para receptores de progesterona (RP). A variação nas taxas de frequência foram atribuídas às diferenças relacionadas com a técnica de execução dos exames, nos diferentes laboratórios testados (RHODES et al., 2000). Um estudo menor, analisou as características de 1362 mulheres operadas por câncer de mama, identificando 81,1% de expressão positiva para receptores de estrogênio (RE) e 64,2% para receptores de progesterona (RP) (HUANG et al., 2005). Os achados da nossa pesquisa estão concordantes com a literatura que estima, na população feminina com câncer de mama dos países Ocidentais, 60 a 80% de expressão positiva para os receptores hormonais (RH) (HUANG et al., 2005; REINERT, BARRIOS, 2015). Na nossa pesquisa, investigamos os registros imunohistoquímicos da expressão dos receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP), tendo observado positividade em 365 casos (79,9%) para receptores de estrogênio (RE) e 339 casos (74,2%) para receptores de progesterona (RP). As análises de estimativas de sobrevida e risco de morte por câncer de mama, de acordo com a expressão dos receptores hormonais, demonstraram uma maior sobrevida para as pacientes que expressaram positividade para os receptores de progesterona (RP) e uma associação preditiva protetora em relação ao prognóstico do câncer de mama. As pacientes que expressaram positividade para receptores de estrogênio (RE) demonstraram uma tendência à maior sobrevida e menor risco de morte, porém, estatisticamente, não apresentaram a significância esperada. O benefício clínico, da investigação dos receptores de progesterona (RP), ainda é controversa na literatura, porém existem evidências que sugerem a existência de um subgrupo de pacientes, com expressão positiva do RP, que possam ter maior benefício na terapia endócrina

adjuvante (OLIVOTTO et al., 2004; HUANG et al., 2005). Na nossa pesquisa, considerando um número de casos semelhantes para investigação da expressão dos dois receptores, evidenciamos que, a positividade ao receptor de progesterona (RP), foi um marcador preditivo mais adequado para estimar a sobrevida e o risco de morte para as pacientes portadoras de câncer de mama.

O emprego da terapia endócrina antineoplásica foi avaliada e identificamos que 368 pacientes (80,5%) receberam algum tipo de tratamento hormonal, representando 97,87% do total das pacientes que apresentaram expressão positiva dos receptores hormonais (RH). As estimativas de sobrevida e o risco de morte foram avaliados e demonstraram tendência favorável de benefício, com redução no número de mortes e maior sobrevida, às pacientes que receberam a terapia. O tratamento hormonal antineoplásico, com base na análise da expressão dos receptores hormonais, principalmente, do receptor de estrogênio, está consagrado na Literatura. O tratamento hormonal, com tamoxifeno durante 5 anos após cirurgia primária na doença localizada, pode promover redução no risco de morte e na recorrência do câncer a longo prazo para as pacientes submetidas ao tratamento (DAVIES et al., 2011). Dados consistentes na literatura estimam redução na taxa de recorrência e mortalidade por câncer de mama para as pacientes submetidas à terapia hormonal adjuvante, porém, estima-se que 30% das pacientes, ainda, poderão apresentar recidivas e evoluir para doença metastática (BARRIOS et al, 2012; GOLDHIRSCH et al., 2013; REINERT, BARRIOS, 2015).

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano, Her-2, está amplificado, ou seja, hiperexpresso em aproximadamente 25 a 30% das pacientes portadoras de câncer de mama, correlacionando-se com a patogênese e acarretando uma proliferação maior de células tumorais e, conseqüentemente, com pior prognóstico (SLAMON et al., 2001; WOLFF et al., 2014). Com base nas conclusões do estudo epidemiológico *Amazona*, estimou-se para o Brasil que, cerca de 20% das pacientes portadoras de câncer de mama, apresentam a doença Her-2 positiva (SIMON et al., 2009). Em nosso estudo, identificamos 90 pacientes com Her-2 hiperexpresso e que representaram 19,7% dos casos. As estimativas de sobrevida, embora menor para esse grupo, não apresentaram significância estatística.

As pacientes com câncer de mama Her-2 hiperexpresso representam um subgrupo especial, pois apresentam um comportamento clínico e biológico mais agressivo na evolução do câncer. Estas evidências estimularam o desenvolvimento de terapia alvo anti-Her-2, cujo primeiro agente biológico desenvolvido foi o Trastuzumab (Herceptin®) que demonstrou benefícios clínicos significativos no tratamento da doença metastática e no tratamento adjuvante do câncer de mama Her-2 hiperexpresso (SLAMON et al., 2001; PICCART-GEBHART et al., 2005; COATES et al., 2015). Evidências recentemente publicadas, demonstraram que há dificuldade de acesso aos serviços públicos de saúde para a utilização de terapia alvo anti-Her-2 em pacientes com câncer de mama avançado e, conseqüentemente, maior número de mortes prematuras (DEBIASI et al., 2016). Investigamos, também, a utilização de terapia alvo anti-Her-2, e observamos que 49 pacientes (54,4%) portadoras de hiperexpressão de Her-2 receberam a terapia alvo com Herceptin®. As estimativas de sobrevida para as pacientes que receberam terapia alvo anti-Her-2 e para as pacientes que não receberam a terapia não foram, estatisticamente, diferentes e, na análise univariada, o risco relativo (HR) foi favorável ao grupo de pacientes que receberam a terapia. Estes dados investigados demonstraram que quase 50% das pacientes não receberam a terapia alvo anti-Her-2, embora sem diferença estatística significativa nas estimativas de sobrevida, o risco relativo (HR) revelou uma tendência de benefício protetor às pacientes que receberam terapia alvo anti-Her-2 com Herceptin®. A significância estatística estimada pode não ter sido obtida devido ao pequeno número de casos analisados ou pelo tempo de seguimento ainda insuficiente para avaliar o desfecho morte por esta variável.

O índice de proliferação (Ki-67) é considerado um dos mais importantes biomarcadores para selecionar o tratamento e determinar o prognóstico de pacientes portadoras de câncer de mama que expressam receptores hormonais positivos (BUSTREO et al., 2016). Embora ainda não haja reprodutibilidade e consenso nas séries estudadas para determinação do ponto de corte que classifica os tumores em baixo grau e, conseqüentemente, melhor prognóstico, e os tumores de alto grau que conferem um pior prognóstico às pacientes, há evidências para classificar os tumores em baixo grau, os tumores que expressam ki-67 entre 14 e 20% e os de alto grau, os tumores que expressam grau maior que 20% (DENKERT et al., 2013; COATES et al., 2015; DOWSETT et al., 2015). Na nossa pesquisa, investigamos a

expressão imuno-histoquímica do Ki-67 e, assumindo os critérios estabelecidos através do Consenso de St Gallen, 2015, consideramos tumores de baixo grau os índices de proliferação menores que 14% e de alto grau, os tumores que expressaram um grau maior ou igual a 14% (COATES et al., 2015). Assim, identificamos 132 casos (28,9%) de baixo grau e 325 casos (71,1%) de alto grau, sendo que ocorreram 21 mortes (15,9%) no grupo de baixo grau e 72 mortes (22,2%) no grupo de pacientes classificadas como de alto grau. As curvas de estimativas de sobrevida demonstraram uma tendência de menor sobrevida às pacientes classificadas com Ki-67 de alto grau. Na análise univariada, o risco relativo de morte por câncer de mama foi 1,55 vezes maior para as pacientes que expressaram um Ki-67 de alto grau. Em recente estudo Italiano, que incluiu 1.688 mulheres com câncer de mama, foi identificado um risco significativamente maior às pacientes classificadas com Ki-67 de alto grau e sugere uma mudança na estratificação do grau de risco de 14% para 20% na expressão do Ki-67 (BUSTREO et al., 2016).

Os estudos de expressão de genes têm sido extremamente relevantes para a compreensão da biologia do câncer de mama que apresentam comportamento e desfechos clínicos distintos (PARKER et al., 2009; SOTIRIOU, PHIL, PUZSTAI, 2009). A descoberta biológica dos quatro principais subtipos de câncer de mama causados por diferentes subconjuntos de anormalidades genéticas e epigenéticas permitem uma compreensão melhor da heterogeneidade dos tumores e suas diferenças no comportamento clínico (KOBOLDT et al., 2012). Estes avanços foram fundamentais para aprimorar a classificação de sub-tipos de tumores e otimizar os tratamentos para o câncer de mama (COATES et al., 2015; PRAT et al., 2015). O último consenso de atualização, em St Gallen, recomendou a classificação molecular na abordagem terapêutica das pacientes, com câncer de mama, e apontou uma preocupação com a qualidade e acesso aos testes moleculares para determinar desta classificação (COATES et al., 2015). Na coorte de Erechim, investigamos os registros imuno-histoquímicos da expressão dos receptores hormonais, do receptor do fator de crescimento epidérmico (Her-2) e do índice de proliferação (ki-67) para avaliar a frequência dos casos, de acordo com a classificação molecular proposta pelo Consenso de St Gallen. De acordo com a classificação, foram calculadas as suas respectivas estimativas de sobrevida e risco para o desfecho morte por câncer de mama. Identificamos 111 pacientes (24,3%)

classificadas com perfil luminal A, 216 pacientes (47,3%) com perfil Luminal B Her-2 negativo, 64 pacientes (14%) com perfil Luminal B Her-2 positivo, 26 pacientes (5,7%) com perfil Her-2 Hiperexpresso e 40 pacientes (8,8%) com perfil Triplo negativo. Analisando o número de eventos ocorridos durante o período de seguimento, observamos um número maior de mortes nos subgrupos Her-2 Hiperexpresso e Triplo-negativos, com taxas de 26,% e 40%, respectivamente. Os subgrupos Luminal A, Luminal B Her-2 negativo e Luminal Her-2 positivo apresentaram taxas de 16%, 19,2% e 17%, respectivamente. As curvas de estimativas de sobrevida demonstraram uma tendência de significância de menor sobrevida para as pacientes com perfil molecular Triplo negativo, Luminal B Her-2 negativo, Luminal B Her-2 positivo, Her-2 Hiperexpresso, Triplo negativo, respectivamente ($p=0,076$). Na análise univariada, as pacientes com perfil Triplo negativo apresentaram um risco estatisticamente significativo de morte, que corresponde a 2,33 vezes maior em relação às pacientes classificadas com perfil Luminal A. Foram identificados apenas 24,3% dos casos com perfil Luminal A, tendo predominado, na coorte pesquisada, as pacientes classificadas com perfil molecular, biologicamente, mais agressivos. O predomínio do perfil Luminal B pode estar relacionado aos critérios adotados para estabelecer este perfil que considerou o ponto de corte do índice de proliferação (ki-67) em maior ou igual a 14%. Como já referido anteriormente, encontramos discordâncias na literatura para definir o valor ideal do Ki-67 que determinaria o alto grau tumoral (POLLEY et al., 2013; SERRA et al., 2014). Quanto à menor sobrevida e maior risco de morte para o perfil triplo negativo, confirma-se evidências encontradas em grandes séries da literatura. Novamente, a significância estatística, da avaliação do perfil molecular no prognóstico das pacientes da coorte pesquisada pode ter sido afetada pelo insuficiente número de casos pesquisados ou pouco tempo de seguimento para ocorrência do desfecho de interesse.

Um estudo de coorte Alemão, que incluiu 4102 pacientes femininas com câncer de mama não metastático, com seguimento de 2003 a 2012, identificou o subgrupo Luminal A em 44% dos casos, Luminal B Her-2 negativo em 31,8%, Luminal B Her-2 positivo em 6,2%, Her-2 Hiperexpresso em 5% e Triplo negativo em 12,3 % dos casos. As estimativas de sobrevida global, em 5 anos, para as pacientes com perfil Luminal A, foram de 95,1% (IC95%: 93,7-96,5); para as pacientes Luminal B Her-2 negativo, foram de 88,7% (IC 95%: 86,2-91,2); para as

pacientes Luminal B Her-2 positivo, foram de 92,5% (IC 95%: 87,9-97,1); para as pacientes com perfil Her-2 Hiperexpresso, foram de 85,6% (IC95%: 78,6-92,6) e para as pacientes com perfil Triplo negativo, foi de 78,5% (IC 95%: 73,8-83,2) (HENNIGS et al., 2016). Um estudo espanhol, que avaliou a distribuição dos casos de câncer de mama de acordo com os subtipos moleculares e analisou o desfecho morte, encontrou resultados semelhantes quanto à frequência de casos estratificados pelos subtipos. Na análise do risco relativo de morte, ajustada pelos subgrupos, verificou um risco de morte para o perfil Her-2 Hiperexpresso e Triplo negativo de 3,16 (IC 95%: 2,26-4,41) e 2,55 (IC 95%: 1,96-3,32), respectivamente (PUIG-VIVES et al.,2013). No estudo de base populacional italiano, de 3.381 casos investigados, foi encontrado a seguinte frequência de distribuição de acordo com o perfil molecular: Luminal A (42%), Luminal B Her-2 negativo (27%), Luminal B Her-2 positivo (14%), Her-2 Hiperexpresso (7%) e Triplo negativo (11%). O risco relativo de morte também foi significativamente maior para as pacientes com perfil molecular Her-2 hiperexpresso e Triplo negativo (MINICOZZI et al., 2013). Um estudo brasileiro, realizado na região nordeste, investigou uma coorte de 633 pacientes, sendo validados 269 casos para a classificação molecular, encontrou a seguinte frequência dos subtipos moleculares: Luminal A foram 64 casos (23,79%), Luminal B 120 casos (44,61%), Her-2 Hiperexpresso 39 casos (14,5%) e Triplo negativos foram 46 casos (17,1%). As estimativas de sobrevida em 5 anos, de acordo com os subgrupos moleculares, Luminal A, Luminal B, Her-2 Hiperexpresso e Triplo negativo, encontradas no estudo, foram respectivamente de 92,86%, 84,76% e 75,0% (ANDRADE et al., 2014). No estudo citado anteriormente, as frequências encontradas do subtipo Luminal B foram semelhantes às investigadas no nosso estudo de Erechim.

Assim, conforme investigado na coorte de Erechim e, em conformidade com a literatura, as análises prognósticas do câncer de mama de acordo com o perfil molecular da doença representam uma ferramenta importante para prever o desfecho clínico, sendo que as pacientes que apresentam positividade para receptores hormonais, classificadas nos subtipos Luminais, obtêm uma estimativa de sobrevida maior e, menor risco de morte, em comparação às pacientes classificadas com perfil Her-2 Hiperexpresso ou Triplo negativo.

A abordagem terapêutica do câncer de mama está cada vez mais alvo-específica de acordo com as características biológicas investigadas no tumor. As evidências demonstram que o emprego de tratamentos personalizados proporcionam maior benefício clínico para as pacientes portadoras de câncer de mama (GOLDHIRSCH et al., 2013; COATES et al., 2015). Nesta pesquisa, investigamos o impacto na sobrevida e risco de morte do câncer de mama, de acordo com os tipos de tratamentos mais comumente utilizados na coorte de pacientes portadoras de câncer de mama, sem no entanto, analisar especificamente cada subgrupo de pacientes. A quimioterapia foi realizada em 340 pacientes (74,4%) e a radioterapia foi realizada por 289 pacientes (63,2%) da coorte pesquisada. Nas análises de estimativas de sobrevida e risco de morte por câncer de mama, durante o período de seguimento, não houve diferenças estatísticas significativas entre a realização ou não dos tratamentos investigado. Dados epidemiológicos produzidos pelo estudo *Amazona*, que investigou 4722 mulheres, demonstrou que 88,2% das pacientes receberam quimioterapia e 76% receberam radioterapia complementar (SIMON, 2009). Existem evidências, consistentes na literatura, que comprovam o benefício clínico da quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia antineoplásicas, com redução das taxas de recidiva e morte para grupos selecionados de pacientes portadoras de câncer de mama submetidas aos tratamentos adjuvantes (DARBY et al., 2011; BOUGANIM et al., 2013; KUNKLER et al., 2014). Apesar destas evidências, na nossa pesquisa, não observamos diferenças prognósticas significativas entre a realização ou não dos tratamentos adjuvantes com quimioterapia ou radioterapia, possivelmente, por não realizarmos as análises de acordo com subgrupos específicos categorizados pela idade, grau histológico, estadiamento ou perfil molecular. O tipo de cirurgia realizado foi investigado em 456 pacientes e identificamos 181 pacientes (39,6%) submetidas à cirurgia conservadora, com 23 mortes (12,7%) durante o seguimento, e 275 pacientes (60,2%) submetidas à cirurgia radical (mastectomia), com 70 mortes (25,5%) durante o período de acompanhamento. As estimativas de sobrevida e análise do risco de morte, demonstraram diferenças significativas favoráveis às pacientes submetidas à cirurgia conservadora pois, as pacientes submetidas à cirurgia radical, apresentaram um risco de morte de 2,1 vezes maior. Estas informações obtidas, na pesquisa, demonstram que a radicalidade da cirurgia não proporciona maior benefício em relação à sobrevida, e pelo contrário,

proporcionou um maior risco de morte às pacientes. As análises de subgrupos específicos e a associação com outras variáveis poderiam ser investigadas para esclarecer se há algum perfil biológico mais agressivo que caracterizou as pacientes submetidas à cirurgia radical. Além disto, investigar a existência de comorbidades às pacientes que foram submetidas à cirurgia radical no momento do diagnóstico, que poderia ter contribuído para este pior desfecho, na coorte pesquisada. Na literatura, é histórica a mudança de paradigmas que envolvem a abordagem cirúrgica das pacientes portadoras de câncer de mama localizado. Ao longo dos anos, observamos uma transição da radicalidade cirúrgica para procedimentos conservadores sobre a mama e axila, com complementação da radioterapia adjuvante, sem comprometer a eficiência no controle da doença (DARBY et al., 2011). Atualmente, já consolidadas as evidências do benefício da cirurgia conservadora na abordagem da doença limitada, surgem questionamentos sobre qual seriam os limites ideais de margens cirúrgicas e qual a melhor abordagem dos linfonodos comprometidos na axila (COATES et al., 2015).

No manejo clínico, das pacientes com câncer de mama, é fundamental conhecer os grupos específicos de pacientes que se beneficiam de terapias sistêmicas com quimioterapia, estimando o seu real benefício na sobrevida das pacientes, sendo este, um desafio constante. Um reconhecido programa, *on line*, da web, conhecido como *Adjuvant!*, realiza um cálculo de probabilidades de sobrevida em 10 anos e o possível benefício da quimioterapia para as pacientes. É um programa consagrado para a tomada de decisão na terapêutica, que foi validado em grandes séries mundiais, porém insuficiente para incluir toda a complexidade das variáveis relacionadas ao câncer de mama (MOOK et al., 2009).

As neoplasias de mama são diferentes na sua história natural e nas diferentes respostas aos tratamentos entre si (PEROU et al., 2000). Existem vários fenótipos de tumores que determinam um retrato molecular próprio para cada neoplasia. Estas alterações fenotípicas são decorrentes de diversos sinais de transcrição que estão envolvidos na oncogênese ocasionando uma diversidade biológica de tumores (PEROU et al., 2000; NIK-ZAINAL et al., 2016). O entendimento da complexidade gênica do câncer de mama é um desafio contínuo aos pesquisadores.

A descoberta de novos marcadores moleculares envolvidos na patogenia do câncer de mama são fundamentais para otimizar o tratamento e determinar com

maior segurança o prognóstico das pacientes portadoras da doença. Além dos marcadores já consolidados na prática clínica, como a expressão dos receptores de estrogênio, receptores progesterona, Her-2 e ki-67, há necessidade de subcategorizar algumas neoplasias que apresentam negatividade de expressão para os biomarcadores conhecidos e, desta forma, evoluem com comportamentos biológicos e desfechos clínicos mais agressivos (INOUE, FRY, 2016).

Neste sentido, vários estudos buscam identificar marcadores moleculares que independentes ou associados, aos marcadores existentes, possam identificar subgrupos de pacientes para tratamentos mais eficazes e seletivos. Alguns marcadores pesquisados, como *cyclin D1*, *cyclin E*, *DBC1*, *p53*, *INK4a/ARF*, *TBX2/3* e *VEGF*, expressam diferenças prognósticas em alguns subgrupos de tumores, porém não se consolidaram na prática clínica (TANEJA et al., 2010; LEE et al., 2011).

Diante da complexidade e heterogeneidade da biologia do câncer de mama, surge a necessidade de investigar o efeito prognóstico de novas moléculas, como a Sirtuína-1 (SIRT-1), em que há evidências de que as alterações da sua expressão, independente ou associada a outras variáveis pesquisadas, podem ter influência na história natural da doença.

Sirtuínas são uma família de sete proteínas (SIRT-1-7) identificadas em mamíferos, classificadas como histonas da Classe III, pois dependem da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para exercer suas atividades na desacetilação e mediação de diversas funções metabólicas celulares (CANTÓ et al., 2009; FINKEL, DENG, MOSTOSLAVSKY, 2009; WIERMAN, SMITH, 2014; LI et al., 2016). As Sirtuínas-1 (SIRT-1) são moléculas lábeis que circulam no ambiente nuclear, citoplasmático e das membranas exercendo ações de sinalização sob ação positiva ou negativa com diversas moléculas e substratos importantes na regulação epigenética (CANTÓ et al, 2009; LEE et al., 2011; LI et al, 2016). Biologicamente, em humanos, a SIRT-1 está relacionada com diversos processos críticos das células, dentre estes, a estabilidade genômica, a proliferação, a resistência, a resposta ao stress e o envelhecimento das células (CAO, SHI, WANG, 2015; FINKEL, DENG, MOSTOSLAVSKY, 2009; LI et al., 2016). Neste contexto, vários estudos correlacionaram a SIRT-1 com etapas da iniciação e proliferação celular na oncogênese, porém, em alguns modelos a SIRT-1 atua com função supressora e em

outros com função promotora do câncer. Diante da complexidade de fatores envolvidos na tumorigênese, ainda permanece controversa a função da SIRT-1 nestes modelos (LI, LUO, 2011).

As alterações epigenéticas, incluindo modificações de histonas, são críticas para a carcinogênese mamária, porém a associação da expressão da SIRT1 com as características clínicas e o prognóstico do câncer de mama não foram totalmente esclarecidas (RIZK, SHAHIN, SHAKER, 2016). As alterações no grau de expressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) e de outras moléculas, relacionadas com as vias de sinalização das células tumorais, têm sido investigadas em diversos tipos de tumores, inclusive no câncer de mama, porém a associação do grau destas expressões com o prognóstico clínico das pacientes ainda não foram definitivamente determinados (LEE et al., 2011; CAO et al., 2014; CAO et al., 2015).

Nesta pesquisa, investigamos a expressão da SIRT-1 por imuno-histoquímica em 123 casos de pacientes portadoras de câncer de mama, que representaram 26,9% dos casos da coorte de Erechim-RS. De acordo com os critérios metodológicos estabelecidos para a investigação, identificamos alteração na expressão da SIRT-1 em 114 pacientes (92,7%), sendo que 9 pacientes (7,3%) apresentaram ausência da expressão. As pacientes com alteração no grau da expressão nuclear da SIRT-1 foram investigadas e observamos, 71 (57,7%) casos com expressão fraca, 35 casos (28,5%) com expressão moderada e 8 casos (6,5%) com expressão forte da SIRT-1.

Estes achados confirmam a hipótese de que há alteração na expressão da SIRT-1 nas pacientes portadoras de câncer de mama, porém em graus de expressão variados. Mesmo considerando que as técnicas laboratoriais para a investigação da expressão da SIRT-1 não são uniformizadas e há escassez de pesquisas, nesta área, os dados encontrados na pesquisa de Erechim-RS são concordantes com as informações da literatura as quais sugerem que a alteração na expressão da SIRT-1 tem associação com o câncer de mama. (RIZK, SHAHIN, SHAKER, 2016).

Com o objetivo de investigar as estimativas de sobrevida e o risco de morte pelo câncer de mama, de acordo com o grau da expressão da SIRT-1 e sua associação com as demais variáveis pesquisadas na coorte de Erechim, as pacientes foram classificadas em dois grupos. O grupo classificado como SIRT-1

negativa foi composto pelas pacientes portadoras de câncer de mama que não expressaram alteração da SIRT-1 e pacientes que apresentaram expressão da SIRT-1 fraca ou moderada, totalizando 115 pacientes (93,5%). O Grupo classificado como SIRT-1 hiperexpressa foi composto pelas 8 pacientes que expressaram grau forte da SIRT-1 (6,50%). Para análise do desfecho de interesse, durante o período de seguimento da coorte, foram observadas 30 mortes (26,1%) no grupo SIRT-1 negativa e 5 mortes (62,5%) no grupo SIRT-1 hiperexpressa. As estimativas medianas de sobrevida, calculadas para o desfecho morte por câncer de mama durante o seguimento da coorte de Erechim, revelaram menor sobrevida global estatisticamente significativas para as pacientes do grupo SIRT-1 hiperexpressa. Foram calculados os riscos relativos para o desfecho de interesse na pesquisa pelo modelo univariado (Cox). Na análise não ajustada, encontramos um risco relativo (HR) de 2,66 vezes maior de morte para as pacientes que apresentaram hiperexpressão da SIRT-1 em relação ao grupo de pacientes que não apresentaram hiperexpressão da SIRT-1. No modelo univariado, que calculou o efeito da SIRT-1 no risco de morte por câncer de mama, ajustado pelas demais variáveis pesquisadas, observamos que a SIRT-1 manteve a associação de maior risco de morte quando ajustada pela idade (HR 2,86; IC95% 1,11-7,38; $p=0,030$); histologia (HR 2,79; IC95% 1,07-7,28; $p=0,036$); status dos linfonodos axilares (HR 2,73; IC95% 1,06-7,04; $p=0,037$); expressão de Her-2 (HR 2,82; IC95% 1,07-7,44; $p=0,036$); realização de tratamento quimioterápico (HR 2,90; IC95% 1,11-7,60; $p=0,030$) e realização de tratamento radioterápico (HR 2,71; IC95% 1,05-7,01; $p=0,040$). Os dados revelaram forte associação com pior prognóstico e maior risco de morte para as pacientes que apresentaram hiperexpressão da SIRT-1 e idade mais elevada, hiperexpressão da SIRT-1 e comprometimento metastático dos linfonodos axilares e hiperexpressão da SIRT-1 e hiperexpressão do Her-2.

Os resultados obtidos, na análise univariada, que indicam maior risco de morte para a associação entre, a expressão da SIRT-1 e a realização da quimioterapia ou radioterapia, deve ser interpretada com cautela, porém pode sugerir que as pacientes com hiperexpressão da SIRT-1 apresentam mecanismos de resistências tumorais à quimioterapia sistêmica, conforme sugerido em alguns estudos (LI, LUO, 2011; CHEN et al., 2012; CAO, SHI, WANG, 2015).

O modelo de Cox multivariado foi construído com objetivo de testar e verificar a significância estatística das informações prognósticas obtidas no modelo univariado. Neste cenário de regressão multivariada, a variável grau da expressão da SIRT-1 foi ajustada e controlada de acordo com variáveis prognósticas tradicionais no câncer de mama, e que haviam apresentado significância no modelo univariado, como a Idade, o status dos linfonodos, a classificação TNM, o grau histológico do tumor, a expressão dos receptores hormonais, o Her-2, o índice ki-67 e o perfil molecular. De forma consistente e significativa observamos que, as pacientes classificadas com hiperexpressão da SIRT-1 apresentaram menor sobrevida e maior risco de morte do que as pacientes classificadas com ausência da hiperexpressão, em diversos cenários de modelo multivariados criados para controlar o efeito do grau de expressão da SIRT-1, no prognóstico das pacientes portadoras de câncer de mama.

A partir das informações obtidas nestas análises, evidenciou-se uma estimativa de pior prognóstico e maior risco de morte para as pacientes que apresentaram hiperexpressão da SIRT-1, independentes da idade do diagnóstico, do envolvimento metastático dos linfonodos axilares e do perfil molecular do câncer de mama.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são relevantes e sugerem que as pacientes portadoras de câncer de mama com hiperexpressão da SIRT-1 possam apresentar um perfil biológico mais agressivo, independente da análise de outros fatores ou variáveis prognósticas clássicas. Algumas evidências na literatura sugerem que um fator importante na regulação da SIRT-1 é a proteína p53. Estas proteínas poderiam apresentar interações e estar implicadas num ciclo de *feedback* próprio e que, por desequilíbrio, ocasionaria a alteração da expressão de uma ou ambas (PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011).

Um estudo recente que, investigou uma população específica, avaliou os níveis séricos de SIRT-1 e as alterações no polimorfismo do gene que codifica a SIRT-1 em pacientes portadoras de câncer de mama e encontrou uma associação significativa entre o maior nível sérico de SIRT-1, polimorfismo do gene e o prognóstico no câncer de mama (RIZK, SHAHIN, SHAKER, 2016).

A meta-análise asiática, publicada em 2015, foi o primeiro estudo que investigou a correlação da expressão da SIRT-1 com fatores prognósticos

clássicos, como o estadiamento TNM (AJCC) e status dos linfonodos axilares na sobrevida de pacientes com câncer de mama. Neste estudo, foram incluídas seis pesquisas totalizando 604 pacientes e foi verificado uma associação significativa entre alterações na expressão de SIRT-1 e menor sobrevida por câncer de mama. Nas análises realizadas foram investigadas, a expressão de SIRT-1, o estadiamento TNM (AJCC) e o status dos linfonodos axilares, tendo sido verificado uma associação significativa entre a maior expressão de SIRT-1, estágios clínicos mais avançados e envolvimento metastático dos linfonodos axilares (CAO et al., 2015).

Algumas pesquisas recentes, na carcinogênese mamária, sugerem modelos teóricos considerando uma interação de complexos mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos nos processos de iniciação e desenvolvimento do câncer. As investigações pressupõe que as alterações epigenéticas poderiam ser reversíveis e estariam relacionadas a alterações na expressão de proteínas e moléculas que regulam o metabolismo das histonas, metilação do DNA e níveis de expressão do RNA mensageiro (BYLER et al., 2014). Estas evidências demonstram a complexidade da oncogênese mamária e a possibilidade de que as alterações na expressão da SIRT-1 possam estar implicadas na caracterização de algum subgrupo especial de câncer de mama.

Para entender o efeito da hiperexpressão da SIRT-1, no câncer de mama, e explicar o desfecho clínico de pior prognóstico, com base na revisão da literatura e evidências encontradas, estamos propondo uma síntese do modelo teórico hipotético. O tecido tumoral é caracterizado pela flutuação nas concentrações de oxigênio, diminuição da oferta de nutrientes e pH ácido, ocorrendo aumento de consumo de glicose e secreção do lactato aumenta (HARJES, BENSAD, HARRIS, 2012). A hiperexpressão da SIRT-1 no núcleo celular ocasionaria um desequilíbrio metabólico, stress celular, ativação de vias sinalizadores da angiogênese e alterações na expressão da via PI3K (proteína fosfatidilinositol 3-quinase), que estão relacionadas aos receptores de tirosina-quinase, provocando assim um aumento de proliferação celular e perda da capacidade de apoptose celular (BYLES et al., 2010). A hiperativação de moléculas SIRT-1 alteraria a expressão da proteína p53 (fator de transcrição que regula o ciclo celular) ocasionando desregulação das vias de sinalização dos receptores esteroidais (ELANGO VAN et al. 2011; MOORE, DAI,

FALLER, 2012). Este desequilíbrio homeostático intracelular acarretaria uma inibição de ligantes relacionados à transcrição dos receptores hormonais, capaz de mudança de fenótipos no câncer de mama. (MOORE, DAI, FALLER, 2012). Este ambiente celular alterado, se tornaria favorável à ocorrência de resistência dos tumores às terapias empregadas e à progressão das células tumorais e, conseqüentemente, expressando um perfil molecular tumoral com comportamento biológico mais agressivo e piores desfechos clínicos para as pacientes.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar que a maior parte desta pesquisa foi temporalmente retrospectiva e, portanto, as informações investigadas para a composição da base de dados tem sua origem em registros de prontuários médicos, hospitalares e laboratoriais. Ocorreram dificuldades para obtenção de algumas variáveis de interesse para composição da coorte de 457 pacientes femininas, portadoras de câncer de mama, pois havia documentos incompletos nos registros dos prontuários médicos hospitalares. Desta forma, reiteramos que para o sucesso e confiabilidade das informações utilizadas nas pesquisas clínicas retrospectivas, que têm como base os registros médicos hospitalares, é fundamental que os dados relativos a cada paciente estejam preenchidos de forma correta e completa.

As informações resultantes da pesquisa documental deste estudo devem ser interpretadas com a devida dimensão de um estudo epidemiológico que caracteriza uma população regional com câncer de mama, levando em consideração às limitações de uma série retrospectiva. Contudo, os resultados obtidos na investigação da expressão da SIRT-1 que evidenciaram impacto no prognóstico das pacientes com câncer de mama, apesar da limitação da pesquisa em 123 casos, requer o rigor científico e os questionamentos necessários para interpretá-los e servir de estímulo para novos estudos com finalidade de investigar estes achados e outras, possíveis, associações.

Apesar das limitações acima mencionadas, a pesquisa gerou resultados importantes que revelaram algumas características clínicas, biológicas, moleculares e do tratamento de uma população específica de mulheres com câncer de mama. As informações foram úteis para comparar os resultados com populações de outros países e do Brasil, avaliando, desta forma, as características de cada região e a qualidade de saúde prestada às pacientes com câncer de mama.

Os dados epidemiológicos gerados, nesta pesquisa, serão úteis e estarão à disposição de pacientes, médicos, profissionais da área da saúde e aos gestores para que, a interpretação dos resultados, possam gerar ações benéficas à saúde da mulher. Importante relatar que, identificamos nesta pesquisa, um contingente excessivo de mulheres diagnosticadas em estágios avançados da doença e, conseqüentemente, com menor estimativa de sobrevida. Além disto, as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, em faixas etárias acima dos 60 anos, representaram um subgrupo significativo da população estudada que apresentaram menor estimativa de vida e maior risco de morte por câncer de mama. Estas informações são valiosas para promover ações que possam melhorar a atenção à saúde, em subgrupos específicos de mulheres, com objetivo de melhorar a qualidade do cuidado, evitando mortes precoces por câncer de mama.

A avaliação da expressão de SIRT-1, através da técnica de imunohistoquímica em tecido tumoral, a partir de blocos de parafinas, demonstrou ser viável, porém requer uma uniformização da técnica com o objetivo de padronização das informações e possibilidade de reprodutibilidade e comparação destas informações por outros centros de pesquisa. Os achados encontrados nesta investigação demonstraram que a SIRT-1 foi um marcador prognóstico independente de risco de morte às pacientes portadoras de câncer de mama. As pacientes com hiperexpressão de SIRT-1 caracterizaram um subgrupo especial de câncer de mama que apresentaram pior prognóstico. Nesta pesquisa, a SIRT-1 demonstrou evidências que a credenciam como um “novo biomarcador” relevante no cenário do câncer de mama. Assim, serão necessários novos estudos e futuras investigações prospectivas e em séries maiores para confirmação destes achados e para entender o verdadeiro impacto da hiperexpressão de SIRT-1 no prognóstico do câncer de mama. Além disto, novos estudos permitirão a elaboração de um modelo racional da ação bio-molecular da SIRT-1 permitindo no futuro, o desenvolvimento de fármacos alvo específicos anti-SIRT-1.

Neste contexto de complexidade e heterogeneidade do câncer de mama, os estudos epidemiológicos regionais, que avaliam o impacto de diversos fatores prognósticos na sobrevida e no risco de morte das pacientes, contribuirão para melhor compreensão da história natural desta doença. A interpretação dos

resultados obtidos nesta pesquisa será útil na elaboração de um diagnóstico do cenário do câncer de mama na região e, conseqüentemente, proporcionar conhecimento para efetivar ações no rastreamento, diagnóstico precoce e tratamento oncológico, bem como, na alocação de recursos necessários para estas ações.

10 CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que, na coorte estudada:

- as estimativas medianas de sobrevida por câncer de mama em 5 e 10 anos foram de 79,6% e 69,1%, respectivamente.

- os estratos etários acima de 60 anos, o tamanho tumoral acima de 2 cm, a presença de metástase em linfonodos axilares, o estadiamento clínico avançado (TNM), o grau histológico alto, o perfil molecular Triplo negativo e a cirurgia radical foram fatores de risco associados a pior prognóstico no câncer de mama.

- o perfil de expressão positiva do receptor de progesterona foi uma variável que apresentou associação com melhor prognóstico no câncer de mama.

- as pacientes classificadas com hiperexpressão da Sirtuína-1 (SIRT-1) caracterizaram um subgrupo de mulheres que apresentaram forte associação com pior prognóstico, menor sobrevida e maior risco de morte, no câncer de mama, independente, do ajuste pelas variáveis idade, status dos linfonodos axilares, expressão do Her-2 e índice de proliferação (Ki-67).

- o grau de expressão da SIRT-1 em tecido tumoral demonstrou ser um marcador prognóstico importante na avaliação de risco para mulheres com câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet*. 2015 March 14; 385(9972): 977–1010. Doi:10.1016/S0140-6736(14)62038-9.
- ANDRADE, A.C.M. et al. Molecular breast cancer subtypes and therapies in a public hospital of Northeastern Brazil. *BMC Womens Health*. 2014; 14: 110. Published online 2014 Sep 12. Doi: 10.1186/1472-6874-14-110. PMCID: PMC4166019.
- ASHRAF, N. et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast câncer. *Br J Cancer*. 2006; 95:1056–1061.
- AZIM Jr, H.A. et al. Genomic aberrations in young and elderly breast cancer patients. *BMC Med*. 2015 Oct 15;13(1):266. Doi: 10.1186/s12916-015-0504-3.
- BALLMAN, K. Biomarker: Predictive or Prognostic? *J Clini Oncol*, 2015, vol. 33, n.33, p.3968-3971. Doi:10.1200/JCO.2015.63.3651.
- BARRIOS, C. et al. The sequential use of endocrine treatment for advanced breast cancer: where are we? *Ann Oncol*, 2012, 23: 1378–1386.
- BIGANZOLI, L. et al. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). *Lancet Oncol*. 2012 Apr;13(4):e148-60. Doi: 10.1016/S1470-2045(11)70383-7. Epub 2012 Mar 30.
- BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:417-35.
- BOUGANIM, N. et al. Evolution of sites of recurrence after early breast cancer over the last 20 years: implications for patient care and future research. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139: 603–606.
- BRASIL. Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Resolução 466/12 sobre pesquisa em seres humanos. Disponível em: <<http://conselho.saude.gov.br>>. Acesso em: 28 out. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BUSTREO, S. et al. Optimal Ki67 cut-off for luminal breast cancer prognostic evaluation: a large case series study with a long-term follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 157: 363–371. Published online 2016 May 7. Doi: 10.1007/s10549-016-3817-9.

BYLES V. et al. Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci.* 2010 Oct 7;6(6):599-612.

BYLER, S. et al. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. *Anticancer Res.* 2014; 34:1071–1077. Doi: 34/3/1071 [pii] PMID: 24596345.

CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 2009; 458(7241): 1056–60.

CAO, B.; SHI, Q.; WANG, W. Higher expression of SIRT1 induced resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *J Thorac Dis.* 2015 Apr; 7(4): 711–719. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.01 PMID: PMC4419326

CAO, Y-W. et al. Clinicopathological and prognostic role of SIRT1 in breast cancer patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):616-624. Disponível em:<www.ijcem.com>. Acesso em: 20 jan. 2016.

_____. Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch1 signaling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014.nov 25;33:97. Doi: 10.1186/s13046-014-0097-2.

CARVALHO, F.M. Histopatologia. In: BARROS ACSD; BUZAID AC. Câncer de mama: tratamento multidisciplinar. São Paulo: Dendrix, 2007, p.3-25.

CARVALHO, M.S. et al. Análise de sobrevida: teoria e aplicações em saúde. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2005.

CECILIO, A.P. et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges *Breast Cancer* (Dove Med Press). 2015; 7: 43–49. Published online 2015 Jan 29. Doi: 10.2147/BCTT.S50361. PMID: PMC4317062.

CHACKRABARTY, S.P.; BALARAM, H.; CHANDRASEKARAN, S. Sirtuins: multifaceted drug targets. *Current Molecular Medicine.* 1875-5666, 2011 Dec 1, Vo.11, Issue 9.

CHEN, C. et al. Subtype classification for prediction of prognosis of breast cancer from a biomarker panel: correlations and indications. *Int J Nanomedicine*, 2014;9 1039–1048.

CHEN, H.C. et al. SIRT1 Promotes Tumorigenesis and Resistance to Chemotherapy in Hepatocellular Carcinoma and its Expression Predicts Poor Prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19: 2011-9. Doi: 10.1245/s10434-011-2159-4 PMID: 22146883.

COATES, A. S. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology* 26: 1533–1546, 2015. Doi:10.1093/annonc/mdv221. Published online 4 May 2015. Downloaded from:<<http://annonc.oxfordjournals.org>>. By guest on February 16, 2016.

COLE, M.; JONES, C.; TODD, I. A new anti-estrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer.*1971.25: 270–275.

DALI-YOUCHEF, N. et al. Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. *Ann Med.* 2007; 39: 335–345. Doi: 10.1080/ 07853890701408194 PMID: 17701476.

DARBY, S. et al. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*, 2011. 378(9804):1707–1716. Disponível em:<<http://www.gbcam.org.br/amazona.php>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

DAVIES, C. et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomized trials. *Lancet.* 2011;378(9793): 771–784.

DEBIASI, M. et al. Estimation of Premature Deaths From Lack of Access to Anti-HER2 Therapy for Advanced Breast Cancer in the Brazilian Public Health System. *JGO.*Published online on jgo.ascopubs.org on July 20, 2016. Doi: 10.1200/JGO.2016.005678.

DECOSTER, L. et al. Screening tools for multidimensional health problems warranting a geriatric assessment in older cancer patients: an update on SIOG recommendations. *Annals of Oncology.* 2016; 26: 288–300, 2015. Downloaded from <<http://annonc.oxfordjournals.org/>>. By guest on February 16, 2016.

DELCUVE, G.P. et al. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical Epigenetics.* 2012; 4:5. Disponível em:<<http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/4/1/5>>. Acesso em: 15 out. 2016.

DENKERT, C. et al. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial†. *Annals of Oncology* 24: 2786–2793, 2013. Doi:10.1093/annonc/mdt350 Published online 22 August 2013.

DORNELLAS DE BARROS, A.C.S; MOREIRA LEITE, K.R. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Rev Bras Mastologia.* 2015;25(4):146-55.

DOWSETT, M. et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(22):1656-1664. Doi: 10.1093/jnci/djr393.

ELANGOVAN, S. et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. *Cancer Res.* 2011; 1;71(21):6654-64.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov; 19(5):403-10.

FINKEL, T.; DENG, C-X.; MOSTOSLAVSKY, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature.* 2009 July 30; 460(7255): 587–591. Doi:10.1038/nature08197.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. et al. Comparative Long-term Study of a Large Series of Patients with Invasive Ductal Carcinoma and Invasive Lobular Carcinoma. Loco-Regional Recurrence, Metastasis, and Survival. *Breast J.* 2015 Sep-Oct;21(5):533-7.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St. Gallen International expert Consensus on The Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013; 24(9):2206-23.

GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology.* 27 June 2011.

GREENE, F.L. et al. American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed, New York, NY, USA: Springer, 2002:157-164. Disponível em:<<https://cancerstaging.org/.../AJCC6thEdCancerStagingManualPart>>. Acesso em: 08 dez. 2015.

HAIGIS, M.C.; GUARENTE, L. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging and calorie restriction. *Genes & Development.* 2006. Disponível em:<<http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1467506>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

HALL, et al. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest.* 2013; v.123, n.3, p.973–979. doi:10.1172/JCI64094.

HANDFORTH, C. et al. The prevalence and outcomes of frailty in older cancer: a systematic review. *Ann Oncol* 2015; 26(6):1091-1101.

HANS-PETER, S.; HANS K. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors. 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition Breast Care (Basel). 2013 May; 8(2): 149-154.

HARJES, U.; BENSAD. K.; HARRIS, A.L. Endothelial cell metabolism and implications for cancer therapy. *Br J Cancer.* 2012 Oct 9;107(8):1207-12. doi: 10.1038/bjc.2012.398.

HARTWIG, F.P. et al. Oncogenic somatic events in tissue-specific stem cells: A role in cancer recurrence?. *Ageing Research Reviews*, 13, 2014, p.100–106.

HARRIS, L. N. et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 34. 2016, by American Society of Clinical Oncology. Doi: 10.1200/JCO.2015.65.2289. Downloaded from:<jco.ascopubs.org>. On February 17, 2016.

HENNIGS, A. et al. Prognosis of breast cancer molecular subtypes in routine clinical care: A large prospective cohort study. *BMC Cancer*. 2016; 16: 734.

HORTOBAGYI, G.N. et al. The American Society of Clinical Oncology's Efforts to Support Global Cancer Medicine. *J Clin Oncol* 34(1): 76-82, 2016.

HUANG, H.J. et al. Association between tumour characteristics and HER-2/neu by immunohistochemistry in 1362 women with primary operable breast cancer. *J Clin Pathol* 2005;58:611-616.

HURRIA, A; et al. Improving the evidence base for treating older adults with cancer: American Society Of Clinical Oncology statement. *J Clin Oncol* 2015, vol. 33, n.32, p. 3826-3833.

HWANG, B-J. et al. Histone/protein deacetylase SIRT1 is an anticancer therapeutic target. *Am J Cancer Res*. 2014; v.4, n.3, p.211-221.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. Disponível em:<<http://censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

INOUE, K.; FRY, E.A. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomark Cancer*. 2016; Mar 13;8:25-42. doi: 10.4137/BIC.S38394.

JENUWEIN, T.; ALLIS, CD. Translating the histone code. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5532):1074-80.

JOHNSTONE, R.W.; LICHT, J.D. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target. *Cancer cell*, July 2003, 4 (1): 13–18.

JUSTO, N. et al. A Review of Breast Cancer Care and Outcomes in Latin America. *The Oncologist* 2013; 18:248-256.

KIMBERLY, R. et al. SIRT1 Positively Regulates Breast Cancer Associated Human Aromatase (CYP19A1) Expression. *Mol Endocrinol*, March 2013, 27(3):480–490. Doi: 10.1210/me.2012-1347.

KOBOLDT, D.C. et al. Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2012, 490: 61-70. 10.1038/nature11412.

KRAVCHENKO, J. et al. Breast cancer as heterogeneous disease: contributing factors and carcinogenesis mechanisms. *Breast Cancer Res Treat* ,2011, 128(2):483-493. Doi 10.1007/s10549-011-1347-z. Epub 2011 Jan 12.

KUNKLER, I. H. et al. On behalf of the SIOG Radiotherapy Task Force. Review of current best practice and priorities for research in radiation oncology for elderly patients with cancer: the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) task force. *Annals of Oncology*. 2014; 25:2134-2146.

LEE, B.L. et al: Breast cancer in Brazil: Present status and future goals. *Lancet Oncol* 13:e95-e102, 2012. Doi: 10.1016/S1470-2045(11)70323-0. Source: PubMed.

LEE, H. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2011;42: 204–213.

LEI, L. et al. Clinicopathological Characteristics of Mucinous Breast Cancer: A Retrospective Analysis of a 10-Year Study. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155132.

LI, K.; LUO, J. The role of SIRT1 in tumorigenesis. *N Am J Med Sci (Boston)*. 2011;4(2):104-106.

LI, S. et al. SIRT 1 promotes migration and growth of PDAC cells. *Med Sci Monit*, 2016; 22: 1593-1600.

LIEDTKE, C. et al. The prognostic impact of age in different molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Aug;152(3):667-73. Doi: 10.1007/s10549-015-3491-3.

LIEDTKE, C. et al. The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. 138:591-599. doi 10.1007/s10549-013-2461-x.

LIM. C.S. Human SIRT1: A potential biomarker for tumorigenesis? *Cell Biol Int*. 2007; 31: 636–637. Doi:10.1016/j.cellbi.2006.11.003 PMID: 17433727.

LOCKE, W.J.; CLARK, S.J. Epigenome remodeling in breast cancer: insights from an early model of carcinogenesis. *Breast Cancer Research*, 2012, 14:215. Doi:10.1186/bcr3237.

McHALE, K. et al. Altered expression of prolactin receptor associated signaling proteins in human breast carcinoma. *Modern Pathology*. [2008].

MARIOTTO, A.B. et al. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *JNCI*, 2011: 103(2):117-128.

MAROUS, M. et al. Designs of preoperative biomarkers trials in oncology: a systematic review of the literature. *Annals of Oncology*, 2015, 26:2419-2428.

MASSIMINO, K.P. et al. How Beneficial is Follow-Up Mammography in Elderly Breast Cancer Survivors? *Ann Surg Oncol*. 2016 Oct;23(11):3518-23. Doi: 10.1245/s10434-016-5301-5. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27306905.

MELLINI, P.; VALENTE, S.; MAI, A. Sirtuin modulators: an updated patent review (2012 – 2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015 Jan;25(1):5-15. doi: 10.1517/13543776.2014.982532. Epub 2014 Nov 29.

MINICOZZI, P. et al. Relative and disease-free survival for breast cancer in relation to subtype: a population-based study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(9):1569–1577. Doi: 10.1007/s00432-013-1478-1.

MITCHELL, H.K. *Multivariable Analysis: A Primer for Readers of Medical Research*. *Ann Intern Med*. 2003;138:644-650.

MYERS, E.R. et al. Benefits and Harms of Breast Cancer Screening: A Systematic Review. *JAMA*. 2015;314(15):1615-1634. doi:10.1001/jama.2015.13183.

MOOK, S. et al. Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2009;10:1070–1076. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70254-2.

MOORE, R.L.; DAI, Y.; FALLER, D.V. Sirtuin1 (SIRT1) and steroid hormone receptor activity in cancer. *Journal of Endocrinology*. 2012; Apr;213(1):37-48.

NIK-ZAINAL, S. et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016 May 2;534(7605):47-54. Doi: 10.1038/nature17676.

O'CONNOR, T. et al., *Managing Breast Cancer in the Older Patient*. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013 Jun; 11(6): 341–347.

OLIVOTTO, I.A. et al. Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *J Clin Oncol* 2004;22:1769–70.

PARK, S. et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012 Feb;21(1):50-7. Doi: 10.1016/j.breast.2011.07.008. Epub 2011 Aug 23.

PARKER, J.S. et al. Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10; 27(8): 1160–1167. Published online 2009 Feb 9. Doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52.

- PETKOV, V.I. et al. Breast-cancer-specific mortality in patients treated based on the 21-gene assay: a SEER population-based study. *Breast Cancer*. 2016;2:16017. Disponivel em: <<http://www.nature.com/articles/npjbcancer201617>>. Acesso em: 09 mai. 2016.
- PICCART-GEBHART, M.J. et al: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive. *Breast cancer*. *N Engl J Med*, 2005, 353:1659-1672.
- POLLEY, M.Y. et al. An international Ki67 reproducibility study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(24):1897–1906. Doi: 10.1093/jnci/djt306.
- POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007,117:3155-3163.
- POURTEIMOOR, V.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; PARYAN, M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumor Biol*. 2016, Nov; 37(11):14479-14499. Epub 2016 Sep 20.
- POZNAK, C. V. et al. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Systemic Therapy for Women With Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 33. 2015 by American Society of Clinical Oncology. doi/10.1200/JCO.2015.61.1459. Downloaded from: <jco.ascopubs.org>. On February 17, 2016.
- PRAT, A.; et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015.nov.24 Suppl 2:S26-35. Doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008. Epub 2015 aug 5. PMID: 26253814 Doi: 10.1016/j.breast.2015.07.008.
- PRESEGUÉ-BOSCH, L.; VAQUERO, A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes & Cancer*. 2011. Doi: 10.1177/1947601911417862.
- PUIG-VIVES M. et al. Distribution and prognosis of molecular breast cancer subtypes defined by immunohistochemical biomarkers in a Spanish population-based study. *Gynecol Oncol*. 2013;130(3):609–614. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.05.039.
- RAKHA, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Research*. 2010, 12:207.
- REINERT, T. BARRIOS, H.C. Optimal management of hormone receptor positive metastatic breast cancer in 2016. *Ther Adv Med Oncol*. 2015, vol. 7(6) 304–320 Doi:10.1177/1758834015608993.
- RIZK, S.M.; SHAHIN, N.N; SHAKER, O.G. Association between SIRT1 Gene Polymorphisms and Breast Cancer in Egyptians. *PLoS ONE*. 2016,11(3):e0151901. Doi:10.1371/journal.pone.0151901.
- RHODES, A. et al. Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *J Clin Pathol*, 2000;53:688–96.

ROSENSTOCK, A.S. et al. Short-term mortality in older patients treated with adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 Jun;157(2):339-50.

SAADATMAND, S. et al. Influence of tumour stage at breast cancer detection on survival in modern times: population based study in 173 797 patients. *BMJ* 2015; 351 h4901.doi: 10.1136/bmj.h4901.

SABIANI, L. et al. Breast cancer in young women: Pathologic features and molecular phenotype. *Breast.* 2016;29:109-116. Doi: 10.1016/j.breast.2016.07.007. PMID: 27479041.

SANDERSON, M. et al.. Mammography screening among the elderly: A research challenge. *Am J Med.* 2015 Dec;128(12):1362.e7-14.

SENKUS, E. et al. On behalf of the ESMO Guidelines Committee. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2015; 26 (Supplement 5): v8–v30.doi:10.1093/annonc/mdv298. Downloaded from:<<http://annonc.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

SERRA, K.P. et al., Nova classificação dos carcinomas de mama: procurando o luminal A. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2014;36(12) 575-580.

SESTAK, I. et al. Factors predicting late recurrence for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2013; 105: 1504–1511.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. Doi: 10.3322/caac.21332. Epub 2016 Jan 7. American Cancer Society.

SIMON, S.D. Projeto AMAZONA. Dados preliminares sobre o câncer de mama. Grupo Brasileiro de Estudo de Cancer de Mama. GBCAM, 2009. Disponível em:<<http://www.gbecam.org.br/amazona.php>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

SIMON, S.D. Projeto AMAZONA. Dados preliminares sobre o câncer de mama. Grupo Brasileiro de Estudo de Cancer de Mama. GBCAM. Disponível em:<<http://www.gbecam.org.br/amazona.php>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

SIU, A.L.M.D., MSPH on behalf of the U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med.* 2016;164:279-296. Doi:10.7326/M15-2886.

SHIOVITZ,S.; KORDE, L. A. Genetics of Breast Cancer: a topic in evolution. *Annals Of Oncology*, 2015, 26:1291-1299.

SLAMON, D.J. et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-792. march 15, 2001.DOI: 10.1056/NEJM200103153441101.

SOTIRIOU, C., PHIL, D., PUZSTAI, L. Gene-expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2009; (360:790-800). Disponível em:<www.nejm.org>. AMRIGS Erechim. Acesso em: 19 fev. 2009.

SPARANO, J.A.; MUSS, H.N.P.J. Learning from big data: are we undertreating older women with high-risk breast cancer? *Breast Cancer*. 2016;2:16019. Disponível em:<<http://www.nature.com/articles/npjbcancer201619>>. Acesso em: 05 ago. 2016.

TAN, D. S. W.; MOK, T. S. K.; REBBECK, T. R. Cancer genomics: diversity and disparity across ethnicity and geography. *J Clin Oncol* 34(1): 91-101, 2016.

TANEJA, P. et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2010;4 15–34.

WALLWIENER, C.W. et al. Adjuvant chemotherapy in elderly patients with primary breast cancer: are women ≥ 65 undertreated? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Aug;142(8):1847-53. Doi: 10.1007/s00432-016-2194-4. Epub 2016 jun 27.

WIERNAN, M.B.; SMITH, J.S. Yeast Sirtuins and the Regulation of Aging. *FEMS Yeast Res*. 2014 February; 14(1): 73–88. doi:10.1111/1567-1364.12115.

WILDIERS, H. et al. Management of breast cancer in elderly individuals: recommendations of the International Society of Geriatric. *Lancet Oncol*. 2007. Disponível em:<<http://oncology.thelancet.com>>. Acesso em: 15 out. 2015.

WILTING, R.H.; DANNENBERG, J.H. Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resistance Updates*. 2012.

WELCH, G. et al. Breast-Cancer Tumor Size, Overdiagnosis, and Mammography Screening Effectiveness. *N Engl J Med* 2016;375:1438-47. | DOI: 10.1056/NEJMoa1600249

WOLFF, A.C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Feb; 138(2): 241–256.

ZARDAVAS, D.; BASELGA, J.; PICCART, M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 10, 191–210 (2013); published online 5 March 2013. Doi:10.1038/nrclinonc.2013.29. Disponível em:<www.nature.com/nrclinonc>. Acesso em: 16 fev. 2016.

ANEXOS

ANEXO B – APROVAÇÃO DO PROJETO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
COMISSÃO CIENTÍFICA

Porto Alegre, 24 de setembro de 2013.

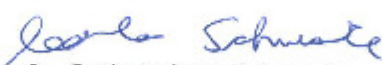
Senhor Pesquisador: JULIANO SARTORI,

A Comissão Científica do IGG apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa **"EPIGENÉTICA, EXPRESSÃO DE SIRTUÍNA 1 (SIRT-1) E PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA"**.

Solicitamos que providencie os documentos necessários para o encaminhamento do protocolo de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Salientamos que somente após a aprovação deste Comitê o projeto deverá ser iniciado.

Atenciosamente,


Profa. Carla Helena Schwanke
Coordenadora da CC/IGG

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - CEP: 91.610-000
Fone: (51) 3336-8153 - Fax (51) 3320-3862
E-mail: igg@pucrs.br
www.pucrs.br/igg

ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EPIGENÉTICA - EXPRESSÃO DE SIRTUÍNA 1 (SIRT-1) E PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA

Pesquisador: ANTONIO LUIZ FRASSON

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23104113.4.0000.5338

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 465.362

Data da Relatoria: 09/11/2013

Apresentação do Projeto:

Este projeto propõe um estudo de coorte histórica (retrospectiva).

A amostra, com base em registros médicos hospitalares, será composta por uma coorte de pacientes femininas portadoras de câncer de mama diagnosticados pelo Laboratório de Anatomia Patológica (Laboratório Medicina Diagnóstica) de Erechim - RS no período de 2003 a 2009 e submetidas a tratamento oncológico nas seguintes instituições de Erechim: Centro de Oncologia Clínica Erechim Ltda (COC), Fundação Hospitalar Santa Terezinha Erechim (FHSTE) e Hospital de Caridade Erechim (HCE). A partir desta coorte serão selecionados blocos de parafina para pesquisa da expressão da sirtuína 1 (SIRT-1) através da técnica de imunohistoquímica.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a expressão de sirtuína 1 (SIRT-1) em biópsias de tecidos tumorais e o seu valor prognóstico (preditivo) independente ou associado às demais variáveis clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas clássicas na sobrevida doença-específica de uma coorte de mulheres portadoras de câncer de mama.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os sujeitos pesquisados. Identificação de um possível marcador preditivo

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)320-3345

Fax: (51)320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 465.362

relevante para o prognóstico do câncer de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O câncer de mama constitui-se numa doença heterogênea que segue despertando muito interesse mundial em pesquisas biomédicas visando entender os processos biológicos e moleculares envolvidos na carcinogênese para desta forma reconhecer as melhores estratégias preventivas e terapêuticas para a doença. As pesquisas são essenciais para contribuir na mudança do cenário epidemiológico do câncer e do impacto social e econômico negativos que a doença pode gerar. Epigenética são alterações fenotípicas que ocorrem na estrutura do DNA e da cromatina sem alterar a sequência de nucleotídeos. Na carcinogênese, várias são as alterações que podem ocasionar instabilidade no genoma, e dentre estas estão as alterações epigenéticas. A Sirtuína 1 (SIRT-1) tem sido implicada em diversos processos biológicos celulares vitais para a expressão gênica e, conseqüentemente a sua hiperexpressão, pode estar relacionada com o comportamento biológico do câncer de mama por desestabilização da regulação dos receptores de estrogênio ou através de outros substratos como p53. Neste cenário são fundamentais os estudos epidemiológicos regionais que avaliam os fatores preditivos clássicos e o impacto de novos fatores moleculares, independentes ou em associação, que possam desta forma, contribuir para a compreensão da oncogênese e proporcionar benefícios no amplo manejo clínico e terapêutico das pacientes portadoras de câncer de mama. O objetivo deste estudo será investigar a expressão de sirtuína 1 (SIRT-1) em biopsias de tecidos tumorais e o seu valor prognóstico (preditivo) independente ou associado as demais variáveis clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas clássicas na sobrevida doença-específica de uma coorte de mulheres portadoras de câncer de mama. Este projeto propõe um estudo de coorte histórica (retrospectiva). As informações sobre a exposição inicial (diagnóstico anatomopatológico) e os desfechos (recidiva, metástases e óbito) serão obtidas por meio da análise de prontuários médico hospitalares, bem como as demais variáveis de interesse. Os dados referentes a variável SIRT-1 serão obtidos através da análise da expressão por imunohistoquímica em blocos de parafina. O período de seguimento da coorte será até dezembro de 2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios são apresentados. O projeto apresenta aprovação na CC do IGG, carta de autorização de todos os locais de pesquisa, orçamento e termo de confidencialidade no uso dos dados.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681
 Bairro: CEP: 90.619-900
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)320-3345 Fax: (51)320-3345 E-mail: cep@puccrs.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS**



Continuação do Parecer: 465.362

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 22 de Novembro de 2013

Assinador por:
caio coelho marques
(Coordenador)

Endereço: Av. Ipiranga, 6681
Bairro: CEP: 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (513)320-3345 **Fax:** (513)320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

ANEXO D - ARTIGO PUBLICADO REVISTA PERSPECTIVA (ERECHIM)

MECANISMOS EPIGENÉTICOS NA CARCINOGENESE MAMÁRIA - O PAPEL DAS SIRTUÍNAS

Epigenetic mechanisms in breast carcinogenesis - the role of sirtuins

Juliano Sartori¹ - Antonio Luiz Frasson²

¹ Médico, Especialização em Medicina Interna e Oncologia Clínica, Mestre em Saúde e Gestão do Trabalho (Saúde da Família) UNIVALI-SC, Doutorando em Gerontologia Biomédica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Professor da URI Câmpus de Erechim. E-mail: jsartori@uricer.edu.br

² Médico, Especialização em Mastologia, Pós-Graduação em Mastologia no Instituto Nacional de Tumores de Milão, Itália, Doutorado em Medicina (Radiologia) pela UFRJ, Coordenador do Centro de Mama da PUCRS, Professor Titular no Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Data do recebimento: 18/10/2014 - Data do aceite: 20/01/2015

RESUMO: O câncer de mama é uma doença heterogênea e molecular complexa com diferentes desfechos clínicos sendo um desafio à compreensão dos mecanismos epigenéticos envolvidos na carcinogênese e sua interação com novas moléculas. O objetivo deste artigo é apresentar uma revisão sobre o papel das sirtuínas na carcinogênese mamária. Foi utilizado o método analítico descritivo através da técnica de pesquisa bibliográfica de artigos originais e de revisão, publicados no período de 2003 a 2014. Sirtuínas (SIRT1-7) são uma família de proteínas intracelulares que, através da desacetilação das histonas exercem diversas funções enzimáticas para a transcrição gênica e manutenção da integridade do genoma. A perda da regulação epigenética por alterações na expressão destas proteínas tem implicação na carcinogênese mamária. As alterações na expressão da SIRT1 estão relacionados com a carcinogênese de forma ambígua tendo efeito de supressão tumoral em alguns casos e a hiperexpressão de SIRT1 relaciona-se à maior proliferação celular por diversos mecanismos e, conseqüentemente, maior agressividade biológica. A compreensão das vias epigenéticas moduladas pelas sirtuínas envolvidas na oncogênese contribui para a correlação de fenótipos moleculares do câncer de mama com seus prognósticos específicos e, o bloqueio farmacológico dessas moléculas, poderá se constituir em potenciais alvo terapêuticos.

Palavras-chave: Sirtuínas. Epigenética. Carcinogênese. Câncer de Mama.

ABSTRACT: Breast cancer is a complex heterogeneous disease with different molecular and clinical outcomes remaining a challenge to the understanding of the epigenetic mechanisms involved in carcinogenesis and its interaction with new molecules. The aim of this article was to present a review on the role of sirtuins in mammary carcinogenesis. A descriptive analytical method was used through technical literature research of original and revised articles published from 2003 to 2014. Sirtuins (SIRT1-7) are a family of intracellular proteins which through histone deacetylation perform various enzymatic functions for gene transcription and maintenance of the genome integrity. The loss of epigenetic regulation by changes in the expression of these proteins has implication in mammary carcinogenesis. Changes in the expression of SIRT1 are ambiguously related to carcinogenesis with tumor suppression effect in some cases and hyper-expression of SIRT1 is related to increased cell proliferation by different mechanisms and consequently increased biological aggressiveness. The understanding of the epigenetic modulated pathways by sirtuins involved in oncogenesis contribute to the correlation of molecular phenotypes of breast cancer with their specific prognoses. The pharmacological block of these molecules may constitute potential therapeutic target.

Keywords: Sirtuins. Epigenetics. Carcinogenesis. Breast Cancer.

Introdução

Nos últimos anos, as alterações epigenéticas ganharam espaço e maior interesse dos pesquisadores para a compreensão da complexidade dos processos de iniciação, perpetuação e progressão das diversas neoplasias malignas, dentre elas do câncer de mama. Epigenética são eventos fisiológicos que ocorrem no núcleo e citoplasma tendo como alvo a cromatina que, sem alterar a sequência do DNA, regulam a transcrição gênica. A programação epigenética é vital para o desenvolvimento e crescimento normal das células e está relacionada com diversos processos embriogênicos, expressão de genes tecido-específicos e silenciamento gênico (PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; WILTING; DANNENBERG, 2012). Vários são os mecanismos de regulação epigenética, porém as alterações na expressão gênica devido a modificações na acetilação da histona e a metilação do DNA na região promotora dos genes são as que tem sido

relacionadas com diversas doenças crônicas em humanos (HALL et al., 2013). As alterações epigenéticas não alteram a sequência de nucleotídeos no gene, o que as diferencia das mutações genéticas (WILTING; DANNENBERG, 2012).

Neste complexo cenário da oncogênese e suas vias de sinalização, e sob o olhar da carcinogênese mamária, um grupo de moléculas proteicas, conhecidas como sirtuínas, tem demonstrado importantes implicações epigenéticas nos processos oncogênicos (HAIGIS; GUARENTE, 2006; POLYAK, 2007; PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; LOCKE; CLARK, 2012). O Câncer de mama tem se apresentado como uma doença heterogênea e complexa com elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Apesar de inúmeros avanços e estratégias terapêuticas, ainda é a principal causa de mortalidade por câncer em mulheres, em diversos países (MALVEZZI et al., 2014).

No Brasil, estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer), indicam que a

doença será responsável por 57.120 novos casos até o fim de 2014, representando 156 diagnósticos por dia. A taxa de incidência para a região Sul é de 71 casos para 100 mil mulheres. Em relação ao ano de 2012, são 4.440 ocorrências a mais da doença. O aumento da incidência é justificado pela adoção de um estilo de vida que compreende: maternidade tardia (depois dos 30 anos), multiparidade, consumo de bebida alcoólica, sedentarismo e má alimentação que podem ocasionar o sobrepeso e a obesidade. Além desses fatores de risco, as mulheres com história familiar de câncer de mama, especialmente se uma ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmãs), foram acometidas antes dos 50 anos, apresentam mais chances de desenvolver a doença. Se detectado na fase inicial, as chances de cura são de 90% a 99%. Nos estágios mais avançados da doença, elas caem para 40% a 50%. De acordo com o INCA, a taxa de mortalidade continua elevada, muito provavelmente porque a doença é diagnosticada em fases avançadas. A OMS (Organização Mundial da Saúde) projeta 27 milhões de novos casos de câncer para o ano de 2030 em todo o mundo e 17 milhões de mortes pela doença, sendo que os países em desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil (INCA, 2014).

Muitos fatores envolvidos na gênese do carcinoma de mama ainda são desconhecidos. Portanto, entender a heterogeneidade tumoral a partir das interações morfo-fisiológicas, bioquímicas, genéticas e epigenéticas, enfim do microambiente celular, com a compreensão de novos atores moleculares, é fundamental para estabelecer estratégias eficazes de tratamento e prevenção do câncer de mama (POLYAK, 2007; KRAVCHENKO et al., 2011).

O objetivo deste artigo foi apresentar uma revisão descritiva sobre o papel das sirtuínas na carcinogênese mamária.

Material e Métodos

Artigo de revisão descritiva, estruturado através de pesquisa bibliográfica realizada em artigos científicos (localizados nas bases de dados SciELO e Medline/Pub Med), em dissertações e teses (localizadas no portal da Capes) e em livros. Para a busca do material bibliográfico, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: câncer de mama, carcinogênese, oncogênese, epigenética e sirtuínas e suas correlatas em inglês, breast cancer, carcinogenesis, oncogenesis, epigenetics and sirtuins. Foram consideradas publicações originais e de revisão, do período de 2003 a agosto de 2014, envolvendo o papel das sirtuínas na carcinogênese mamária.

Carcinogênese Mamária

O câncer de mama tem sua origem a partir de uma alteração mutacional genética e epigenética em uma única célula da unidade ducto-tubular da mama. Essa célula tronco embrionária ou somática desenvolve um clone celular alterado que se desenvolve e prolifera de acordo com as características fenotípicas que adquire a partir da exposição a novos danos ao DNA, instabilidade do genoma e perda da integridade dos mecanismos de reparo dessas modificações (POLYAK, 2007; HARTWIG et al., 2014).

A teoria do modelo hierárquico de carcinogênese tem o seu início a partir de células tronco ou progenitoras, independente dele ser esporádico ou hereditário, sendo que a oncogênese ocorre devido à desregulação na sua função de autorenovação, e assim o tumor preservaria um nicho de células com as propriedades das células tronco (CARVALHO, 2007; HARTWIG et al., 2014).

Neste modelo, a célula tronco geneticamente modificada pode evoluir para uma das duas linhagens de células neoplásicas

mamárias: as células epiteliais luminais, que expressam receptores hormonais ou estrogênicos, e as células basais mioepiteliais, que formam tumores basaloides, sem expressão de receptores hormonais. Na medida em que eventos genéticos e epigenéticos ocorrem neste clone celular alterado, o tumor se diferencia em subtipos de fenótipos de acordo com a expressão de genes e perfis moleculares distintos. Assim, de acordo com a expressão de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e expressão de proteínas HER-2 (proteínas receptoras trans-membrana da família tirosina-quinases) nas células tumorais, são classificados em cinco subtipos moleculares de câncer de mama: basal-like, luminal A, luminal B, HER2 + / ER, e normal breast-like (SOTTIRIOU; PHIL; PUZSTAI, 2009).

Estas características moleculares representam fenótipos malignos diferentes e, conseqüentemente, desfechos clínicos e prognósticos distintos, requerendo estratégias de manejo terapêutico específico (SOTTIRIOU; PHIL; PUZSTAI, 2009). Em geral, os tumores basais, triplos negativos (expressão negativa de: RE, RP-, HER-2-) tem pior prognóstico enquanto que os luminais A, melhor prognóstico (LIHDYKE et al., 2013).

É importante salientar que o modelo estocástico de carcinogênese preconizava que o processo iniciador tinha origem em uma modificação genética em qualquer tipo de célula adulta, seja epitelial luminal ou mioepitelial. De qualquer forma a aceitação desse modelo de carcinogênese mamária, a partir de células tronco ou progenitoras, não implica que todos os cânceres tenham obrigatoriamente essa origem (BARROS, 2010; VERSCHUUR-MAES et al., 2012; HARTWIG et al., 2014).

Os estudos em carcinogênese mamária tem como alvo as células epiteliais tumorais enquanto que outras células (stroma) que

compõem o microambiente não foram talvez exploradas o suficiente, como as células mioepiteliais, endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos, e outros tipos celulares. Estas células, classicamente não epiteliais, podem modular a especificidade do tecido normal da mama, bem como participar da diferenciação, crescimento, sobrevivência, polaridade e até comportamento invasivo de células tumorais (VERSCHUUR-MAES; DE BRUIN; VAN DIEST, 2012; ZARDAVAS; BASELGA; PICCART, 2013). Estas evidências instigam a perspectiva de desenvolvimento de novos modelos experimentais de carcinogênese mamária e permitem a concepção de alvos terapêuticos anticâncer dirigidos a outras subpopulações celulares e moleculares envolvidas na proliferação neoplásica da mama.

O carcinoma mamário pode ser classificado, de acordo com a origem do evento de iniciação genética, em hereditário (familiar) ou esporádico. Todo processo oncogênico tem origem genética e epigenética; entretanto, somente 5 a 10% são considerados hereditários com transmissão e herança de suscetibilidade familiar (BARROS, 2010). Alguns genes supressores herdados quando mutados estão relacionados com o carcinoma de mama. Dentre eles estão o BRCA 1 e 2 (breast cancer 1, 2), TP53, PTEN, CDH1, STK1 e ATM (POLYAK, 2007). As mulheres com mutação nos genes BRCA 1 e 2 representam o grupo de maior importância epidemiológica na hereditariedade pois apresentam risco de desenvolvimento do carcinoma de mama ao longo da sua vida na ordem de 50 a 80%, além de risco cumulativo de câncer de ovário, em torno de 15 a 40% (GOMES et al., 2011).

As mulheres que expressam mutação no gene BRCA 1 apresentam carcinomas caracterizados por comportamento biológico de alto grau, expressão negativa de receptores de estrogênio e progesterona, e expressão negativa de HER-2 conhecidos como triplo

negativos. Os perfis fenótipo basal-like e triplo negativos, correspondem a um grupo de neoplasias mamárias de pior prognóstico com maior probabilidade de gerarem metástases a distância maior predominância de metástases viscerais do que ósseas (SOTIRIOU; PHIL; PUZSTAL, 2009; LIEDTKE et al., 2013). Já as mulheres que expressam mutações conjuntas em BRCA 1 e BRCA 2 desenvolvem neoplasias do tipo carcinoma ductal invasivo ou infiltrativo que apresentam características clínicas e biológicas semelhantes aos cânceres esporádicos (BARROS, 2010).

Atualmente, identificar grupo de mulheres na população em geral que apresentam mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, é uma importante estratégia para rastreamento da suscetibilidade adquirida do câncer de mama. Um estudo populacional aleatório realizado no Rio de Janeiro para identificar a prevalência de mutações BRCA1 e BRCA2 em mulheres portadoras de câncer de mama, observou que as mutações não são incomuns, e sugere que seja estimulada a testagem genética para rastreamento em mulheres brasileiras (GOMES et al., 2011).

A mutação BRCA1, além de proporcionar um risco cumulativo significativo de desenvolvimento de carcinoma mamário, está relacionada com o fenótipo basal-like, que epidemiologicamente, acomete principalmente as mulheres jovens e, além disto, este subtipo molecular apresenta maior dificuldade de ser diagnosticado precocemente por mamografia, devendo ser incluídas outras estratégias de rastreamento como a ressonância nuclear magnética das mamas (BARROS, 2010).

Epigenética – Sirtuínas

O interesse no estudo da epigenética e sua relação com a oncogênese mamária evoluíram rapidamente nos últimos anos pela

compreensão de que as modificações na expressão de genes reguladores da proliferação celular são também motivadas por mecanismos moleculares epigenéticos complexos. Acredita-se que as alterações epigenéticas podem estar envolvidas inclusive em processos de variação da heterogeneidade tumoral (LOCKE; CLARK, 2012).

As alterações fenotípicas que ocorrem na estrutura do DNA e da cromatina sem alterar a sequência de nucleotídeos podem ocasionar a instabilidade do genoma (LOCKE; CLARK, 2012). A expressão gênica é controlada por vários mecanismos epigenéticos e, dentre estes, a metilação do DNA e a acetilação das histonas são os mais importantes no processo de regulação da transcrição gênica (WILTING; DANNENBERG, 2012).

Sirtuínas (SIRT) são uma família de proteínas que tem como alvo a desacetilação das histonas (HDAC) e, para exercer sua função enzimática, requerem um co-fator enzimático, o NAD⁺. Fisiologicamente catalisam a remoção de grupos acetil, levando a condensação da cromatina e repressão transcricional, mantendo a regulação da expressão gênica (PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; YUAN; SU; CHEN, 2013). Estas moléculas estão relacionadas com a regulação do processo de silenciamento celular e implicadas em diversos mecanismos vitais da célula, como apoptose, inflamação, diferenciação e crescimento, envelhecimento, angiogênese, reparo do DNA, stress e balanço energético (CHACKRABARTY; BALARAM; CHANDRASEKARAN, 2011; PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; HALL et al., 2013).

As sirtuínas desempenham um importante papel para a manutenção da integridade do genoma, pois tem a capacidade de detectar mudanças no metabolismo e homeostase energética, além de coordenar respostas para

a manutenção desse equilíbrio. A regulação epigenética, modulada pelas sirtuínas, é fundamental para a regulação da cromatina em resposta às agressões ambientais (PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; HALL et al., 2013).

Existem 7 sirtuínas identificadas nos humanos (SIRT1-7), que são diferentes na sua estrutura entre si e classificadas de acordo com seus domínios ligados ao NAD⁺ e ao Zinco (RAJENDRAN et al., 2011; HALL et al., 2013). Apesar das semelhanças estruturais, as sirtuínas (SIRT1-7) estão localizadas em pontos diferentes e estratégicos no ambiente celular. As evidências experimentais demonstraram que as funções fisiológicas e metabólicas de cada grupo de sirtuínas, também são diferentes entre si e dependem dos substratos envolvidos (YUAN; SU; CHEN, 2013).

Quanto à localização intracelular predominante das sirtuínas, tem-se a seguinte disposição: SIRT1 no núcleo e citoplasma, SIRT 2 no citoplasma, SIRT 3 no núcleo e mitocôndria, SIRT 4 e SIRT 5 na mitocôndria, SIRT 6 no núcleo e, SIRT 7 no nucleólo (RAJENDRAN et al., 2011).

No processo fisiológico de transcrição gênica, as sirtuínas são acetiladas e regulam o fluxo metabólico e o reparo do DNA. Portanto, estas proteínas estariam em estado de desacetilação nas células. Estados de estresse celular ou jejum podem induzir desacetilação seletiva de proteínas, evidenciando aumento da atividade das sirtuínas. Evidências mostram forte relação dessas moléculas com o estresse oxidativo e envelhecimento (RAJENDRAN et al., 2011; HALL et al., 2013).

A perda da regulação epigenética na expressão das sirtuínas, tem sido relacionada com diversos processos inflamatórios influenciadores na patogênese de doenças

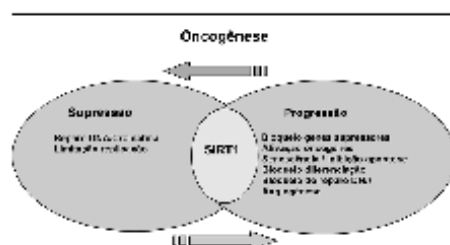
crônicas dos sistemas cardiovascular, neurológico, reumatológico e na gênese das malignidades, dentre elas do câncer de mama (FORD; JIANG; MILNER, 2005; HAIGIS; GUARENTE, 2006; HELTWEG et al., 2006; PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; HARJES; BENSAD; HARRIS, 2012; MOORE; DAI; FALLER, 2012).

Todas as sirtuínas de mamíferos, exceto a SIRT5, foram descritas no envolvimento da tumorigênese. As funções das sirtuínas na carcinogênese são complexas e podem contribuir em ambas as situações: na proliferação e promoção tumoral ou estar envolvidas na supressão tumoral, de acordo com o substrato do contexto celular e molecular (YUAN; SU; CHEN, 2013).

A SIRT1 tem despertado maior interesse investigativo devido à sua relação com a oncogênese dos tumores sólidos, dentre eles do câncer de mama. Na maquinaria intracelular mediada por diversas moléculas, a SIRT1 atua de forma ambígua, tendo uma associação com forças supressivas nos processos tumorais e evidências demonstram íntima relação com a carcinogênese estimulando a proliferação celular (PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; HALL et al., 2013).

A função de supressão tumoral exercida pela ação da SIRT1, relaciona-se à capacidade de aumentar a estabilidade do genoma, através do reparo do DNA e da cromatina e, pela inibição da replicação livre das células. Já a oncogênese é estimulada pela inibição da apoptose celular, senescência, bloqueio da diferenciação celular e de genes supressores, ativação de oncogenes, promoção do crescimento e expansão clonal, estimulação da angiogênese e vasodilatação (PRESEGUÉ-BOSCH; VAQUERO, 2011; YUAN; SU; CHEN, 2013). A figura 1 apresenta a descrição dos mecanismos de ação da SIRT1 na carcinogênese.

Figura 1 - Descrição dos mecanismos de ação da SIRT1 na carcinogênese.



Evidências apontam que a SIRT1 é fundamental para a sinalização ou modulação da ação do estrogênio na ligação com o receptor do estrogênio no câncer de mama. Os receptores de estrogênio desempenham papel fundamental na regulação do desenvolvimento e nas funções da glândula mamária. A relação do estrogênio no processo de iniciação e progressão tumoral é bem conhecida e estima-se que em torno de 70% dos carcinomas mamários expressem positividade para estes receptores (SELVAKUMAR et al., 2011). Desta forma, a hiper-expressão da SIRT1, pode estar relacionada com o comportamento biológico do câncer de mama por desestabilização da regulação dos receptores de estrogênio ou através da ativação em outros substratos como o P53 (ASHRAF et al., 2011).

Outras pesquisas, no entanto, indicam um papel supressor de tumor para a SIRT1. O câncer de mama com mutação em BRCA1 apresentou significativamente níveis mais baixos de expressão de SIRT1 nas células mutadas e o restabelecimento dos níveis de SIRT1 nestas células resultou na inibição do crescimento do tumor, possivelmente por regulação epigenética (YUAN; SU; CHEN, 2013).

A SIRT1 desempenha um papel importante na regulação celular e resposta ao stress em células de mamíferos, promovendo a

sobrevida celular através da inibição da apoptose e da senescência celular. Inúmeros substratos de ação para a SIRT1 tem sido identificados, entre eles, P53, Fatores de transcrição FOXO, receptor gama de peroxissomo e Ku-70. Em um estudo que utilizou um inibidor específico de SIRT1, o sirtinol, em um modelo de carcinoma mamário humano, MCF-7, observou-se inibição da proliferação e crescimento celular mediada por uma via de sinalização Ras-MAPK (OTA et al., 2006).

Evidências clínicas consistentes identificaram que a modificação na expressão da SIRT1, em pacientes com câncer de mama, especificamente a hiperexpressão da SIRT1, foi associada à maior proliferação de células neoplásicas, menor diferenciação celular e, conseqüentemente, maior taxa de recorrência do tumor e menor sobrevida global câncer-específica (DERR et al., 2014).

Perspectivas Futuras- Drogas Alvo Moleculares

A compreensão do amplo espectro de alterações genômicas e epigenômicas que atuam na carcinogênese mamária bem como da complexidade hierárquica das células e do estroma envolvidos, mudou a maneira e a lógica de desenvolvimento de novas drogas alvo específicas. É neste cenário que emergem as sirtuínas como potenciais alvos para o tratamento clínico do câncer (HALL et al., 2013; YUAN; SU; CHEN, 2013).

Há aproximadamente 10 anos, estudos têm demonstrado algumas formas e mecanismos através dos quais o bloqueio ou inibição da desacetilação das histonas podem regredir a proliferação das células neoplásicas, constituindo-se em importantes agentes alvo terapêuticos (JOHNSTONE; LICHT, 2003). A inibição da desacetilação

das histonas pode ocorrer através de três mecanismos básicos: inibição da proliferação celular, indução de apoptose e alteração na sinalização angiogênica. O bloqueio da proliferação celular pode ocorrer por aumento do receptor nuclear responsável pela diferenciação celular, reversão da repressão por fusão de fatores de transcrição ou hiperexpressão de repressora, indução de P21 e diferenciação celular, reativação do silenciamento de genes de supressão tumoral em combinação com a inibição da metilação do DNA transferase e supressão do gene da expressão da telomerase (JOHNSTONE; LICHT, 2003; YUAN; SU; CHEN, 2013; ZARDAVAS; BASELGA; PICCART, 2013).

Os inibidores da desacetilação das histonas (HDAC) atuam para reativar a expressão do gene *ERS1PGR* em carcinomas mamários que não expressam positividade para receptores de estrogênio. A via de super-expressão de *CDH1* que codifica a E-caderina também é ativada com a inibição da desacetilação das histonas (HDAC). O perfil molecular de carcinoma mamário com fenótipo triplo negativo tem sido alvo de experimentos com inibidores de HDAC. Outra situação farmacológica destas moléculas inibidoras de HDAC é melhorar a sensibilidade das células ao trastuzumab, um potente inibidor da via Her-2 (ZARDAVAS; BASELGA; PICCART, 2013).

Além disto, a atuação dos inibidores seletivos da SIRT1 em combinação com quimioterapia, foram recentemente descritos em experimentos com camundongos. Observou-se um sinergismo na eficácia quando estes inibidores foram combinados, ao fluorouracil (5-Fu) e temozolamida (TMZ) e, aplicados em células de câncer mamário ocasionando uma redução da proliferação e viabilidade das células neoplásicas. Tais evidências apontam um modelo lógico que poderá ser utilizado na

terapêutica do carcinoma de mama (HWANG et al., 2014).

Considerações Finais

Os avanços no campo bio-molecular permitiram, nos últimos anos, através da incorporação de novas técnicas biológicas, a identificação e compreensão das vias específicas de sinalização celulares e seus substratos moleculares implicados na carcinogênese mamária. Estudar diretamente o genoma e epigenoma possibilitou uma melhor compreensão da patogênese do câncer nas suas diversas dimensões moleculares. Com estes conhecimentos é possível entender a correlação entre o perfil molecular do carcinoma de mama e seus desfechos clínicos, proporcionando, na prática clínica, diagnósticos mais precisos com perspectivas de tratamento alvo-dirigidos em diversos pontos críticos da carcinogênese.

A compreensão das interações moleculares na oncogênese, além de permitir a identificação de novos biomarcadores e seus fenótipos malignos correspondentes, poderá propiciar o desenho racional de alvos terapêuticos mais eficazes e possíveis estratégias mais eficientes para a prevenção e diagnóstico precoce dessa complexa e heterogênea neoplasia, que é o câncer de mama.

Nesse contexto, as sirtuínas são moléculas emergentes que despertam profundo interesse de pesquisadores para desvendar seu real papel na carcinogênese mamária. Além de explorar suas funções com objetivo prático de melhorar a sobrevida e a qualidade de vida de pacientes portadoras de câncer de mama, poderá contribuir para a identificação de populações de maior risco que deverão ser submetidas a medidas de rastreamento mais eficazes.

REFERÊNCIAS

- ASHRAF, N. et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer* [2006];v. 95, p.1056–1061 doi:10.1038/sj.bjc.6603384.
- BARROS, A.C.S.D. Bases moleculares para a prevenção do câncer de mama. In: ANTUNES RCP; Pedreira AAM, *Prevenção do Câncer*, Barueri, São Paulo; Manole, 2010, p.255 - 277.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2014: incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2012.
- CARVALHO F.M. *Histopatologia*. In: BARROS ACS.D; BUZAID AC. *Câncer de Mama: tratamento multidisciplinar*. São Paulo: Dendrix, 2007, p.3-25.
- CHACKRABARTY, S.P.; BALARAM, H.; CHANDRASEKARAN, S. Sirtuins: multifaceted drug targets. *Current Molecular Medicine*. 1875-5666, 2011 Dec 1, v.11, Issue 9. Database: MEDLINE. Acesso em: 18 dez 2012.
- DERR, R.S. et al. High nuclear expression levels of histone-modifying enzymes LSD1, HDAC2 and SIRT1 in tumor cells correlate with decreased survival and increased relapse in breast cancer patients. *BMC Cancer* [2014]; v.14, n.604. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/604>>. Acesso em: 15 out 2014.
- PORD, J.; JIANG, M.; MILNER, J. Cancer-specific functions of sirt1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res.* [15 nov 2005]; v.65, n. 22, p. 10457-10463. Disponível em: <<http://www.sbc.org.br>>. Acesso em: 05 out 2012.
- GOMES, M.C.B. et al. Prevalência de mutação BRCA 1 e BRCA 2 em pacientes com câncer de mama em uma população do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, 2011; v. 8, n. 27, p.24-28.
- HAGIS, M.C.; GUARENTE, L. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging and caloric restriction. *Genes & Development*. [2006]; v. 20, p.2913-2921. Disponível em: <<http://www.gene.dev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1467506>>. Acesso em: 10 nov. 2012.
- HALL et al. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest.* 2013; v.123, n.3, p.973–979. doi:10.1172/JCI64094.
- HARJES, U.; BENSAD, K.; HARRIS, A.L. Endothelial cell metabolism and implications for cancer therapy. *British Journal of Cancer.* [2012];v.107, p.1207-1212. Disponível em: <<http://www.sbc.org.br>>. Acesso em: 11 out 2012.
- HARTWIG, P.P. et al. Oncogenic somatic events in tissue-specific stem cells: A role in cancer recurrence?. *Ageing Research Reviews*, 13 (2014) p.100–106. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2013.12.004>>. Acesso em: 04 dez 2013.
- HELTWEG, B. et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res.* [15 apr 2006];v. 66, n. 8, p.4368-4377. Disponível em: <<http://www.sbc.org.br>>. Acesso em: 10 set 2012.
- HWANG, H-J, et al. Histone/protein deacetylase SIRT1 is an anticancer therapeutic target. *Am J Cancer Res.* [2014]; v.4, n.3, p.211-221.
- JOHNSTONE, R.W.; LICHT, J.D. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: Is transcription the primary target?. *Cancer Cell*. 2003, v. 4, p.13-18.

ANEXO E - ARTIGO**EXPRESSION GRADE SIRTUIN-1 (SIRT-1) IN TISSUE TUMOR WOMEN WITH
BREAST CANCER: A NEW BIOMARKER PROGNOSIS?**

SARTORI, Juliano

Centro de Oncologia Clínica Erechim, Rua Itália, 878 conj. 201, CEP: 99701-418,
Erechim, RS - Brasil;

SCHNEIDER, Rodolfo Herberto

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga,
6681, CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS - Brasil.

Endereço para correspondência:

Juliano Sartori

Rua Itália, 878 conj. 201, CEP 99701-418, Erechim,RS – Brasil

jsartori@uricer.edu.br

ABSTRACT

Breast cancer is a complex and heterogeneous disease with different clinical outcomes. The investigation of new biomolecular markers are essential to know the prognosis and improve the clinical management of patients. The sirtuin-1 (SIRT-1) is a histone deacetylase implicated in various epigenetic critical functions for the cells and the maintenance of genomic stability. **Objective:** To investigate the grade of expression of the sirtuin-1 (SIRT-1) and the prognostic value in overall survival of women with breast cancer. **Methods:** Retrospective cohort of 457 women with breast cancer undergoing treatment in Erechim-RS from 2003 to 2013 and followed until July 2015. The grade of SIRT-1 expression was investigated by immunohistochemistry in 123 patients (26, 9%) of the cohort. The overall survival specific disease (OS) and risk of death from breast cancer were estimated by Kaplan-Meier and Cox proportional hazards. **Results:** The median age of 57.4 years cohort with OS of 79.6% in 5 years and 69.1% at 10 years, with follow-up time of 61.9 months. The SIRT-1 overexpression was found in 6.5% of cases and characterized a subgroup of women with shorter survival and increased risk of death from breast cancer ($HR = 2.66$; 95% CI 1.03 to 6.86; $p = 0.043$). In regressive multivariate models adjusted for age, status of axillary lymph nodes, Her-2 expression and proliferation index (Ki-67), the grade of expression of the SIRT-1 maintained association with poor prognosis. **Conclusion:** The assessment of the SIRT-1 expression is an independent prognostic biomarker in breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Sirtuin 1. Survival. Carcinogenesis. Repression epigenetics. Prognosis. Immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Breast cancer is a progressive disease with heterogeneous clinical and biological characteristics that is a relevant problem of global public health, because it has high rates of incidence, morbidity and mortality (POLYAK, 2007; SHIOVITZ, KORDE, 2015; HORTOBAGYI et al., 2016). Epidemiologically, breast cancer is the most common malignancy in Europe and the United States, and the second leading cause of cancer related death in women (SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016). In Europe were estimated 464,000 new cases of breast cancer with 131,000 deaths from the disease in 2012 and in the United States for the year 2016, it is estimated about 246,660 new cases of breast cancer in women and 40,450 deaths from the disease (SHIOVITZ, KORDE, 2015; SIEGEL, MILLER, JEMAL, 2016). In Brazil, for the year 2016, were estimated 596,000 new cases of cancer, from these, 57,960 cases are of breast cancer, according to a report published by the National Cancer Institute (BRAZIL, 2016). For the Southern region of Brazil, it was estimated 10,970 new cases of breast cancer for the year 2016, accounting for 25% of all cases of cancer estimated for the women of this region (BRAZIL, 2016).

The prognosis and treatment of breast cancer are based on several biological factors such as age, tumor size, metastases in the axillary lymph nodes, systemic staging, histological grade, expression profile of hormone receptors, expression profile receptor human epidermal growth factor (Her-2) and proliferation index (Ki-67) that have genetic signatures themselves to this disease (SOTIRIOU, PHIL, PUZSTAI, 2009; KOBOLDT et al., 2012; CARVALHO, 2007; SENKUS et al., 2015). Thus, breast cancer constitutes a set of disorders with distinct molecular portraits and needs for its approach, biomedical research to understand the biological and molecular processes involved in their oncogenesis, evolution and mechanisms of resistance of tumor cells and relationship with clinical outcomes (POLYAK, 2007; SHIOVITZ, KORDE, 2015; TAN, MOK, REBBECK, 2016).

The complexity of breast oncogenesis, epigenetic factors, play an important role because they are molecular events involved in various physiological activities of cells and is essential for the regulation of gene expression (LOCKE, CLARK, 2012). Several molecular mechanisms involved in oncogenesis are unknown, but the changes in the acetylation and deacetylation of histones, particularly in the sirtuin family of molecules (Sir2), have been studied and related to carcinogenesis

(BLANDER, GUARENTE, 2012; PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011; HALL et al., 2013).

Sirtuins are intracellular protein molecules, class III of histone deacetylases and they were discovered in *Saccharomyces cerevisiae* yeast (DALI-YOUCHEF et al., 2007; BLANDER, GUARENTE, 2012). In humans, they are a group of proteins composed of seven members with different metabolic functions, is essential for the maintenance of cellular homeostasis and directly related to silencing cellular process (CHACKRABARTY, BALARAM, CHANDRASEKARAN, 2011; PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015).

The sirtuin-1 (SIRT-1) is the main molecule described the sirtuin family (BLANDER, GUARENTE, 2012; MELLINI, VALENTE, MAI, 2015) and have been associated with silencing of genes, cell cycle control, apoptosis, the energy homeostasis and aging (HWANG et al., 2014). This molecule acts in many vital biological processes of cell gene expression and consequently its overexpression may be related to the biological behavior of breast cancer destabilization of the regulation of estrogen receptors or using other substrates such as p53 (ELANGO VAN et al., 2011).

The objective of this research was to investigate the grade of SIRT-1 expression in biopsies of tumor tissue of women with breast cancer and its prognostic value in overall survival specific disease.

METHODS

Study design and population

Research with retrospective design, based on hospital medical records, for composition of a cohort of 457 female patients with breast cancer, diagnosed at the Pathology Laboratory (Medical Laboratory Diagnostics) Erechim-RS and undergoing cancer treatment in the period 2003-2013 in the following Erechim-RS institutions: Erechim Clinical Oncology Center (COC), Erechim Santa Terezinha Hospital (FHSTE) and Erechim Charity Hospital (HCE). The recruitment period for composition of the cohort was the first day of 2003 (date of initial entry into the cohort) and on 31 December 2013 (end date of entry into the cohort). The inclusion

criteria for the composition of the study cohort were diagnosed with breast cancer in women, confirmed by pathological examination, and the completion of cancer treatment from 2003 to 2013. The first 123 consecutive cases which entered the cohort were selected from the first of January 2003, to research the grade of expression of the sirtuin-1 (SIRT-1) by immunohistochemical technique.

Information on the initial exposure (date of histological diagnosis) and the outcome (death) were obtained by analyzing the medical records. The final follow-up date of patients in the cohort, to analyze the outcome (death) was the 31st of July, 2015. On that date, all patients who were alive were censored.

The variables studied or prognostic factors were: age at diagnosis; histological type; nuclear histological grade (low, intermediate and high); status of the axillary lymph nodes (profile of metastatic involvement of axillary lymph nodes); hormone receptors (expression of estrogen and progesterone receptors); cell proliferation ki-67 (low and high grade); grade of expression of human epidermal growth factor receptor (Her-2); TNM staging (AJCC): I to IV; type of treatment used (surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy, anti-Her-2 targeted therapy with Herceptin®) and grade of expression of sirtuin-1 (SIRT-1).

Technique for SIRT-1 expression level research

The grade of SIRT-1 expression was investigated by immunohistochemical technique and the following steps were taken: fixing and obtaining histological sections from the paraffin block with silanized blade Dako, submitted to the technique of immunoperoxidase antigen retrieval performed in Dako instrument, PT Link, with three processing in an integrated, comprising the deparafinization, rehydration and antigen retrieval with FLEX caps (Dako) low or high pH; Incubation with primary antibodies for 20 minutes at room temperature; Use of IgG antibody, SIRT-1 human recombinant enzyme (No. 50081 - Fluorogenic SIRT1) of Bioscience Laboratory (BPS); Amplification was performed with EnVision FLEX (Dako) systems with secondary antibodies conjugated to polymer EnVision and developed with chromogenic system DAB + liquid FLEX (Dako); automated processing platform Dako Autostainer Link 48; conducting internal and external positive controls to test the fidelity of reactions; Mounting of blades in Coversliper Dako Dako with Dako

cover slips; analysis by the pathologist Sector of Immunohistochemistry of Diagnostic Medicine Laboratory by optical microscopy with fluorescence reader.

The criteria used to analyze the grade of expression of the sirtuin-1 (SIRT-1) were as follows:

The percentage level of expression of SIRT-1 determined by the pathologist was recorded as a numeric variable from zero to 100%, according to immunofluorescence reaction SIRT-1 in the nucleus of tumor cells by light microscopy field.

According to the level of expression of SIRT1 obtained in the investigation the patients were classified as:

- **Negative expression** (0): grade of nuclear expression of SIRT1 absent or up to 1% of tumor cells;

- **Low expression** (1+): grade of nuclear expression of SIRT1 between 1 and 49% of the tumor cells (Figure 1);

INSERT FIGURE 1 HERE

- **Moderate expression** (2+): grade of nuclear expression of SIRT1 between 50 and 79% of the tumor cells (Figure 2);

INSERT FIGURE 2 HERE

- **Overexpression** (3+): grade of nuclear expression of SIRT1 above 80% of the tumor cells (Figure 3).

INSERT FIGURE 3 HERE

Statistical analysis

The results were statistically analyzed using SPSS version 21.0. A descriptive analysis of all prognostic variables surveyed in the table with a breakdown of its characteristics and frequencies found was presented.

The survival probabilities each time were estimated using the Kaplan-Meier method and the comparison between the curves was held by the log-rank test. In order to estimate the effects of each variable on survival of patients were created

proportional hazards models Cox (MITCHELI, 2003). Survival curves were decomposed according to the variables in the model of the univariate analysis were presented and the relative risks (hazard ratio, HR) estimated. The confidence intervals were 95%.

The variables that were statistically significant in the univariate analysis and relevance in the pathogenesis of breast cancer were tested in a multivariate model, by the method of Cox proportional hazards. In the final multivariate analysis were calculated the hazard ratio (HR) for each proposed model for investigate possible predictive prognostic associations according to the objective of the study (MITCHELI, 2003).

The study was approved by the Research Ethics Committee of PUCRS as reported number 465.362 of 22nd of November 2013 were adopted ethical research recommendations of Resolution 466/12 of the National Health Council of the Ministry of Health of Brazil.

RESULTS

The cohort median follow-up time was 61.93 months, with a minimum follow-up time was 1.37 months (42 days) and the maximum follow-up time was 153.03 months (12.75 years). At the end of cohort follow-up, 364 patients (79.6%) were alive and were censored on July 31, 2015, and 93 patients (20.4%) died due to breast cancer.

The median age of the study population was 57.48 (SD \pm 27.76 years), and the minimum age was 25 years and the maximum of 92 years.

The characteristics of the population according to the investigated variables are shown in Table 1.

INSERT TABLE 1 HERE

The median overall survival specific disease (OS) obtained at the end of the study, the Kaplan-Meier method was 120.243 months (10.02 years) with a standard deviation of 2,928 (CI 95% 114.504 - 125.982) months. The survival median estimates calculated for the outcome of death from breast cancer were 96.9% in 12

months; 92.1% at 24 months; 88.3% at 36 months; 83.6% in 48 months; 79.6% in 60 months and 69.1% in 10 years. The survival curve is shown in Figure 4.

INSERT FIGURE 4 HERE

The 123 cases selected for investigation of the grade of expression of the SIRT-1, represented 26.9% of the total cohort of female patients with breast cancer (n = 457).

The table 2 shows the description of the cases classified according to the level of expression of SIRT-1 found from the immunohistochemical research and as criteria used for classification. In the analysis of the degree of expression of the SIRT-1, we observed 9 cases (7.3%) that showed no expression; 71 cases (57.7%) classified as low expression; 35 cases (28.5%) classified as moderate expression and 8 cases (6.5%) classified as overexpression.

INSERT TABLE 2 HERE

According to the primary objective in this research were calculated survival median estimates and risk of death in univariate and multivariate Cox models, to check the impact of the grade of SIRT-1 expression in the prognosis of patients investigated. To model these analyzes, patients were grouped and classified into two groups according to overexpression or not the SIRT-1.

Thus, the groups were classified as:

- **Sirtuin-1 (SIRT-1) negative group:** the cases were considered the patients with negative expression (0) and low expression (1+) and moderate expression (2+) of SIRT-1;

- **Sirtuin-1 (SIRT-1) overexpressed group:** we considered the patients with overexpression (3+).

The curves of overall survival specific disease, estimated for 123 patients with breast cancer, compared to the profile of the expression of the sirtuin-1 (SIRT-1) investigated by immunohistochemistry, are shown in Figure 5.

According to the analysis and criteria used in this study, we observed 115 cases (93.5%) with negative expression of sirtuin-1 (SIRT-1), having been 30 deaths in this group, accounting for 26.1% of cases. The median overall survival specific

disease (OS), estimated to patients with negative expression of sirtuin-1 (SIRT-1), was 115.541 months (CI 95% 107.324 - 123.758). The overexpression of sirtuin-1 (SIRT-1) was observed in eight cases (6.50%) and five deaths occurred in this group, accounting for 62.5% of cases. The median overall survival specific disease (OS), estimated to patients with overexpression sirtuin-1 (SIRT-1), was 74.221 months (CI 95% 47.735 - 100.707). The global log-rank test rejected the similarity hypothesis (parallelism) between the survival distributions curves ($X^2: 4.452; p = 0.035$). Thus, the survival curves stratified according to the expression profile of sirtuin-1 (SIRT-1) in patients with breast cancer showed a significant difference between them ($p < 0.05$).

INSERT FIGURE 5 HERE

The group of patients with overexpression of SIRT-1 accounted for 6.5% of the sample investigated. The general characteristics of this sample according to the variables studied are described below:

- The median age was 58 years, and the youngest was 35 and the oldest 77 years.
- The histological type identified in all cases was invasive ductal carcinoma.
- The tumor size was reported as T2 (2cm to 4.9 cm) in four cases (50%) and T3 (> 5.0cm) in four cases (50%).
- The metastatic involvement in axillary lymph nodes was shown in four cases (50%) and four cases (50%) had no metastases in the axillary lymph nodes.
- In the clinical staging (TNM), we identified three patients (37.5%) with stage II (limited disease) and five patients (62.5%) with stage III (advanced).
- The histological grade was ranked as high as in five cases (62.5%) and intermediate in three cases (37.5%).
- The profile of expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) was negative in four cases (50%) and positive in four patients (50%). There was no specific difference in the individual analysis of estrogen and progesterone receptors.
- The cell proliferation index (Ki-67) was high grade in seven patients (87.5%) and identified one case (12.5%) low grade.
- The Her-2 profile was negative in five cases (62.5%) and overexpressed in three cases (37.5%).

- In the classification according to the molecular profiling, we identified one case (12.5%) categorized as Luminal A, three cases (37.5%) categorized as Luminal B Her-2 negative, two (25%) categorized as Her-2 overexpressed and two cases (25%) categorized as negative Triple.

- In the type of surgical treatment used, we observed that five patients (62.5%) were subjected to mastectomy and three patients (37.5%) were subjected to conservative surgery.

- Chemotherapy and radiation were employed in all cases.

- The Hormone therapy was performed in five patients (50%).

- The anti-Her-2 targeted therapy with Herceptin® was done in one case (50%).

In order to check the prognostic effect of the grade of expression of the sirtuin-1 (SIRT-1), according to the risk of death from breast cancer, the hazard ratio were calculated (HR) for the SIRT-1 adjusted for variables selected. The table 3 shows the description of the variables and the respective hazard ratios (HR) obtained in each analysis by univariate Cox regression model. The grade of expression of the SIRT-1 had an HR of 2.66 (95% CI 1.03 -6.86, $p = 0.043$).

INSERT TABLE 3 HERE

The prognostic variables that were significant in the univariate model and which are relevant to the pathogenesis of SIRT-1 were selected for preparation of regressive multivariate models, the Cox model. The selected variables were age, axillary lymph nodes, TNM classification, histologic grade, the Her-2 profile, cell proliferation index ki-67, the profile of hormone receptors and the profile according to the molecular classification. The table 4 shows the description of the models submitted to multivariate analysis of SIRT-1 expression, adjusted according to each group of selected variables.

INSERT TABLE 4 HERE

The SIRT1 presented associated prognosis with increased risk of death from breast cancer, significant and independent, in almost all proposed multivariate models.

DISCUSSION

Breast cancers are different in their natural history, and in different responses to the treatments altogether (PEROU et al., 2000). There are several phenotypes of tumors that determine a specific molecular picture for each cancer. These phenotypic changes are the result of many signs of transcription that are involved in oncogenesis causing a biological diversity of tumors (PEROU et al., 2000; NIK-ZAINAL et al., 2016). Understanding the genetic complexity of breast cancer is an ongoing challenge to researchers.

The discovery of new molecular markers involved in the pathogenesis of breast cancer are fundamental to optimize treatment and determine with greater certainty the prognosis of patients with the disease. In addition to markers already established in clinical practice, as the expression of estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2 and Ki-67, it is necessary subcategorize some cancers that exhibit expression of negativity for the known biomarkers and thereby evolve biological behavior and more aggressive clinical outcomes (INOUE, FRY, 2016).

In this regard, several studies seek to identify molecular markers that independent or associated with existing markers can identify subgroups of patients for more effective and selective treatments. Some surveyed markers, such as cyclin D1, cyclin E, DBC1, p53 INK4a / ARF, TXB2 / 3 and VEGF express prognostic differences among subgroups of tumors, but are not consolidated in clinical practice (TANEJA et al, 2010;. LEE et al., 2011).

Given the complexity and heterogeneity of breast cancer biology, there is a need to investigate the prognostic effect of new molecules, such as sirtuin-1 (SIRT-1), where there is evidence that changes in their expression, independent or associated the other surveyed variables may affect the natural history of the disease.

Sirtuins are a family of seven proteins (SIRT-1-7) identified in mammals, classified as histone Class III, because they depend on the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD +) to perform their activities in the deacetylation and mediation of

various cellular metabolic functions (CANTÓ et al., 2009; FINKEL, DENG, MOSTOSLAVSKY, 2009; WIERMAN, SMITH, 2014; LI et al., 2016). Sirtuin-1 (SIRT-1) are labile molecules circulating in the nuclear environment, cytoplasmic and membrane exerting positive or negative action in signaling actions with various molecules and substrates important in epigenetic regulation (CANTÓ et al, 2009; LEE et al.,2011; LI et al, 2016). Biologically, in humans, SIRT-1 is related to many critical processes of cells, among these, the genomic stability, cell proliferation, resistance, response to stress and cell aging (CAO, SHI, WANG, 2015; FINKEL, DENG, MOSTOSLAVSKY, 2009; LI et al., 2016). In this context, several studies correlated with SIRT-1 stages of initiation and cell proliferation in oncogenesis, but in some models, the SIRT-1 operates with suppressive function and in other as a cancer promoter function. Given the complexity of factors involved in tumorigenesis, it remains controversial the function of SIRT-1 in these models (LI LUO, 2011).

Epigenetic changes, including histone modifications are critical for mammary carcinogenesis, but the association of expression of SIRT1 with the clinical features and prognosis of breast cancer have not yet been clarified (RIZK, SHAHIN, SHAKER, 2016). Changes in the level of expression of sirtuin-1 (SIRT-1) and other molecules related to the signaling pathways of tumor cells have been investigated in many types of tumors, including breast cancer, but the association grade these expressions with the clinical prognosis of patients have not been definitively determined (Lee et al, 2011;. CAO et al, 2014;. CAO et al, 2015.).

In our research, we investigated the expression of SIRT-1 by immunohistochemistry in 123 cases of patients with breast cancer, which accounted for 26.9% of cases in the Erechim-RS cohort. According to the methodological criteria established for the investigation, we identified change in SIRT-1 expression in 114 patients (92.7%), and 9 patients (7.3%) showed no expression. Patients with changes in the grade of nuclear expression of SIRT-1 were investigated and observed, 71 (57.7%) patients with low expression, 35 cases (28.5%) with moderate expression and 8 cases (6.5%) overexpressing the SIRT-1.

These findings confirm the hypothesis that there is a change in the expression of SIRT-1 in patients with breast cancer, but in varying grades of expression. Even though the laboratory techniques for the investigation of SIRT-1 expression are not uniform and there is lack of research in this area, the data found in the Erechim-RS research are consistent with the information in the literature that suggest that the

change in SIRT-1 expression is associated with breast cancer (RIZK, SHAHIN, SHAKER, 2016).

In order to investigate the estimates of survival and the risk of death from breast cancer, according to the grade of SIRT-1 expression and its association with other variables studied in the Erechim cohort, patients were classified into two groups. The group classified as SIRT-1 negative was composed of patients with breast cancer who did not express change of SIRT-1 and patients with expression of SIRT-1 low or moderate, totaling 115 patients (93.5%). The group classified as SIRT-1 overexpressed was composed of eight patients who expressed high grade of SIRT-1 (6.50%). To analyze the outcome of interest, during cohort follow-up period, it was observed 30 deaths (26.1%) in negative SIRT-1 group and five deaths (62.5%), in overexpression SIRT-1 group. The survival median estimates calculated for the outcome of death from breast cancer during follow-up of the Erechim cohort, showed lower overall survival statistically significant for the overexpression SIRT-1 group patients. The risks related to the outcome of interest in the survey were calculated by univariate model (Cox).

In univariate analysis unadjusted, we found a relative risk (HR) of 2.66 times greater of death for patients who had SIRT-1 overexpression in relation to the group of patients without overexpression of SIRT-1. Through the univariate Cox model were calculated SIRT-1 effect on the risk of death from breast cancer, and adjusted for other variables studied and observed that the SIRT-1 maintained the association of increased risk of death when adjusted for age (HR 2.86 ; CI 95% 1.11 - 7.38; $p = 0.030$); histology (HR 2.79, CI 95% 1.07 - 7.28; $p = 0.036$); status of the axillary lymph nodes (HR 2.73, CI 95% 1.06 - 7.04; $p = 0.037$); Her-2 expression (HR 2.82, CI 95% 1.07 - 7.44; $p = 0.036$); completion of chemotherapy (HR 2.90, CI 95% 1.11 - 7.60; $p = 0.030$) and conducting radiation treatment (HR 2.71, CI 95% 1.05 - 7.01; $p = 0.040$). The data demonstrated an association with poor prognosis and a higher risk of death for patients who had SIRT-1 overexpression and higher age, SIRT-1 overexpression and metastatic involvement of axillary lymph nodes and overexpression of SIRT-1 and overexpression of Her- 2.

The results of the univariate analysis showed increased risk of death for the association of SIRT-1 expression and the completion of chemotherapy or radiation therapy should be interpreted with caution. However, it suggests that patients with SIRT-1 overexpression have mechanisms of tumor resistance to systemic

chemotherapy, as suggested in some studies (LI LUO, 2011; Chen et al, 2012; CAO, SHI, WANG, 2015).

The Cox multivariate model was constructed in order to test and verify the statistical significance of prognostic information obtained in the univariate model. In multivariate regression scenario, the variable grade of SIRT-1 expression was set and controlled according to traditional prognostic variables in breast cancer, and which had presented significance in the univariate model, such as age, the status of the lymph nodes, classification TNM, the histological grade of the tumor, the expression of hormone receptors, Her-2, ki-67 index and the molecular profile. Consistently and significantly, we observed that the patients classified with SIRT-1 overexpression showed lower survival and higher risk of death than patients classified with the absence of overexpression in several multivariate model scenarios created to control the effect of the grade of expression the SIRT-1, in the prognosis of patients with breast cancer.

From the information obtained in these analyzes, it was evident an estimate of poor prognosis and increased risk of death for patients with overexpression of SIRT-1, independent of the age of diagnosis of metastatic involvement of axillary lymph nodes and the molecular cancer profile breast cancer.

The results obtained in this study are relevant and suggest that patients with breast cancer with SIRT-1 overexpression have a more aggressive biological profile, independent from analysis of other factors or classical prognostic variables. Some evidence in the literature suggests that an important factor in SIRT-1 regulation is the p53 protein. These proteins could present interactions and be involved in its own feedback loop and, on balance, rise to a change in expression of one or both (PRESEGUÉ-BOSCH, VAQUERO, 2011).

A recent study investigated a specific population, evaluated the serum levels of SIRT-1 and changes in gene polymorphism coding for the SIRT-1 in patients with breast cancer and found a significant association between higher serum levels of SIRT-1 gene polymorphism and prognosis in breast cancer (RIZK, SHAHIN, SHAKER, 2016).

The Asian meta-analysis, published in 2015, was the first study investigating the correlation of SIRT-1 expression with classical prognostic factors, such as the TNM staging (AJCC) and status of axillary lymph nodes on survival of patients with breast cancer. In this study, we included six trials totaling 604 patients and it was

found a significant association between changes in SIRT-1 expression and lower survival from breast cancer. In the analyzes we investigated the expression of SIRT-1, TNM staging (AJCC) and the status of the axillary lymph nodes, having been a significant association between increased expression of SIRT-1, more advanced clinical stages and metastatic involvement of lymph nodes axillary (CAO et al., 2015).

Some recent research in breast carcinogenesis suggest theoretical models considering a complex interaction of genetic and epigenetic mechanisms involved in the processes of initiation and development of cancer. Investigations assumes that epigenetic changes may be reversible and be related to changes in the expression of proteins and molecules that regulate the metabolism of histones, DNA methylation and mRNA expression levels (Byler et al., 2014). These evidences indicate the complexity of the breast oncogenesis and the possibility that changes in the expression of SIRT-1 may be involved in the characterization of a particular subgroup of breast cancer.

To understand the effect of overexpression of SIRT-1 in breast cancer, and explain the clinical outcome of poor prognosis, based on literature review and findings, we propose a synthesis of the hypothetical theoretical model. Tumor tissue is characterized by fluctuations in the oxygen concentration, reduced nutrients supply and acidic pH, with increased glucose consumption and lactate secretion increases (HARJES, BENSAAD, HARRIS, 2012). Overexpression of SIRT-1 in the cell nucleus would cause a metabolic imbalance, cellular stress, the activation flags angiogenesis pathways and changes in pathway expression PI3K (phosphatidylinositol 3 protein kinase), which are related to tyrosine kinase receptors, thus causing an increase of cell proliferation and apoptosis loss of capacity (BYLES et al., 2010). The hyperactivation of SIRT-1 molecules alter the expression of p53 protein (transcription factor that regulates the cell cycle) resulting in dysregulation of signaling pathways of steroid receptors (ELANGOVAN et al. 2011; MOORE, DAI, FALLER, 2012). This intracellular homeostatic imbalance would lead to an inhibition of ligands related to the transcription of hormone receptors, capable of changing phenotypes in breast cancer. (MOORE, DAI, FALLER, 2012). This altered cellular environment, become favorable to the development of resistance of tumors to therapy employed and progression of tumor cells and thereby expressing a tumor molecular profile with more aggressive biological behavior and poor clinical outcome for patients.

Final considerations

The evaluation of SIRT-1 expression by immunohistochemistry technique in tumor tissue from paraffin blocks proved feasible but requires a standardization of the technique aiming at standardization of information and the possibility of reproducibility and comparison of this information by other research centers. The findings of this research have shown that SIRT-1 was the independent prognostic marker of risk of death for patients with breast cancer. Patients with SIRT-1 overexpression featured a special subgroup of breast cancer that had a poorer prognosis.

In this research, SIRT-1 showed evidence that qualify it as a "new biomarker" relevant in breast cancer setting. Thus, further studies are needed and future prospective investigations and in larger series to confirm these findings and to understand the true impact of overexpression of SIRT-1 in the prognosis of breast cancer. Moreover, new studies will allow the development of a rational model of biomolecular action of the SIRT-1 allowing in the future, the development of specific target drugs anti-SIRT-1.

CONCLUSIONS

This study shows us to conclude that, in the cohort studied:

- The median estimates of overall survival for breast cancer in 5 and 10 years were 79.6% and 69.1%, respectively.
- Patients classified overexpressing sirtuin-1 (SIRT-1) characterized a subgroup of women who were strongly associated with poor prognosis, shorter survival and increased risk of death in breast cancer, independent from the adjustment for age, status axillary lymph nodes, Her-2 expression and proliferation index (Ki-67).
- The grade of expression of SIRT1 in tumor tissue may be an important prognostic marker in risk assessment for women with breast cancer.

Disclosure: There is no potential conflict of interest.

REFERÊNCIAS

BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 family of protein deacetylases. Annual review of biochemistry. 2004;73:417-35.

BRAZIL. Ministry of Health. National Secretariat of Health Care. National Cancer Institute. Coordination of Prevention and Surveillance. Estimate 2016: Cancer Incidence in Brazil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BYLES V. et al. Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. Int J Biol Sci. 2010 Oct 7;6(6):599-612.

BYLER, S. et al. Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy. Anticancer Res. 2014; 34:1071–1077. Doi: 34/3/1071 [pii] PMID: 24596345.

CANTÓ, C. et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. Nature, 2009; 458(7241): 1056–60.

CAO, B.; SHI, Q.; WANG, W. Higher expression of SIRT1 induced resistance of esophageal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. J Thorac Dis. 2015 Apr; 7(4): 711–719. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.01 PMID: PMC4419326

CAO, Y-W. et al. Clinicopathological and prognostic role of SIRT1 in breast cancer Patients: a meta-analysis. Int J Clin Med 2015; 8 (1):. 616-624. Available at: <www.ijcem.com>. Access: 20 January 2016.

_____. Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch1 signaling in breast cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2014.nov 25;33:97. Doi: 10.1186/s13046-014-0097-2.

CARVALHO, F. M. Histopathology. In: BARROS ACSD; Buzaid AC. Breast cancer: a multidisciplinary treatment. Sao Paulo: Dendrix, 2007, p.3-25.

CHACKRABARTY, S.P.; BALARAM, H.; CHANDRASEKARAN, S. Sirtuins: multifaceted drug targets. Current Molecular Medicine. 1875-5666, 2011 Dec 1, Vo.11, Issue 9.

CHEN, H.C. et al. SIRT1 Promotes Tumorigenesis and Resistance to Chemotherapy in Hepatocellular Carcinoma and its Expression Predicts Poor Prognosis. Ann Surg Oncol. 2012; 19: 2011-9. Doi: 10.1245/s10434-011-2159-4 PMID: 22146883.

DALI-YOUCHEF, N. et al. Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. Ann Med. 2007; 39: 335–345. Doi: 10.1080/ 07853890701408194 PMID: 17701476.

ELANGOVAN, S. et al. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor α in breast cancer. Cancer Res. 2011; 1;71(21):6654-64.

FINKEL, T.; DENG, C-X.; MOSTOSLAVSKY, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. 2009 July 30; 460(7255): 587–591. Doi:10.1038/nature08197.

HALL, et al. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest*. 2013; v.123, n.3, p.973–979. doi:10.1172/JCI64094.

HARJES, U.; BENSaad, K.; HARRIS, A.L. Endothelial cell metabolism and implications for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2012 Oct 9;107(8):1207-12. doi: 10.1038/bjc.2012.398.

HORTOBAGYI, G.N. et al. The American Society of Clinical Oncology's Efforts to Support Global Cancer Medicine. *J Clin Oncol* 34(1): 76-82, 2016.

HWANG, B-J. et al. Histone/protein deacetylase SIRT1 is an anticancer therapeutic target. *Am J Cancer Res*. 2014; v.4, n.3, p.211-221.

INOUE, K.; FRY, E.A. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. *Biomark Cancer*. 2016; Mar 13;8:25-42. doi: 10.4137/BIC.S38394.

KOBOLDT, D.C. et al. Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2012, 490: 61-70. 10.1038/nature11412.

LEE, H. et al. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2011;42: 204–213.

LI, K.; LUO, J. The role of SIRT1 in tumorigenesis. *N Am J Med Sci (Boston)*. 2011;4(2):104-106.

LI, S. et al. SIRT 1 promotes migration and growth of PDAC cells. *Med Sci Monit*, 2016; 22: 1593-1600.

LOCKE, W.J.; CLARK, S.J. Epigenome remodeling in breast cancer: insights from an early model of carcinogenesis. *Breast cancer Research*. 2012 14:215. Doi:10.1186/bcr3237

MELLINI, P.; VALENTE, S.; MAI, A. Sirtuin modulators: an updated patent review (2012 – 2014). *Expert Opin Ther Pat*. 2015 Jan;25(1):5-15. doi: 10.1517/13543776.2014.982532. Epub 2014 Nov 29.

MITCHELI, H.K. Multivariable Analysis: A Primer for Readers of Medical Research. *Ann Intern Med*. 2003;138:644-650.

MOORE, R.L.; DAI, Y.; FALLER, D.V. Sirtuin1 (SIRT1) and steroid hormone receptor activity in cancer. *Journal of Endocrinology*. 2012 Apr; 213(1):37-48.

NIK-ZAINAL, S. et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016 May; 2;534(7605):47-54. Doi: 10.1038/nature17676.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406: 747-52.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007,117: 3155-3163.

PRESEGUÉ-BOSCH, L.; VAQUERO, A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes & Cancer*. 2011. Doi: 10.1177/1947601911417862.

RIZK, S.M.; SHAHIN, N.N; SHAKER, O.G. Association between SIRT1 Gene Polymorphisms and Breast Cancer in Egyptians. *PLoS ONE*. 2016, 11 (3):e0151901. Doi:10.1371/journal.pone.0151901.

SENKUS, E. et al. On behalf of the ESMO Guidelines Committee. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 2015; 26 (Supplement 5): v8- v30.doi: 10.1093 /annonc /mdv298. Downloaded from: <<http://annonc.oxfordjournals.org>>. Accessed: February 1. 2016

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. Doi: 10.3322/caac.21332. Epub 2016 Jan 7. American Cancer Society.

SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. Genetics of Breast Cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 2015, 26:1291-1299.

SOTIRIOU, C., PHIL, D., PUZSTAI, L. Gene-expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2009; (360: 790-800). Available at: <www.nejm.org>. AMRIGS Erechim. Access: 19 February 2009.

TAN, D. S. W.; MOK, T. S. K.; REBBECK, T. R. Cancer genomics: diversity and disparity across ethnicity and geography. *J Clin Oncol* 34(1): 91-101, 2016.

TANEJA, P. et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2010:4 15–34.

WIERMAN, M.B.; SMITH, J.S. Yeast Sirtuins and the Regulation of Aging. *FEMS Yeast Res*. 2014 February; 14(1): 73–88. doi:10.1111/1567-1364.12115.

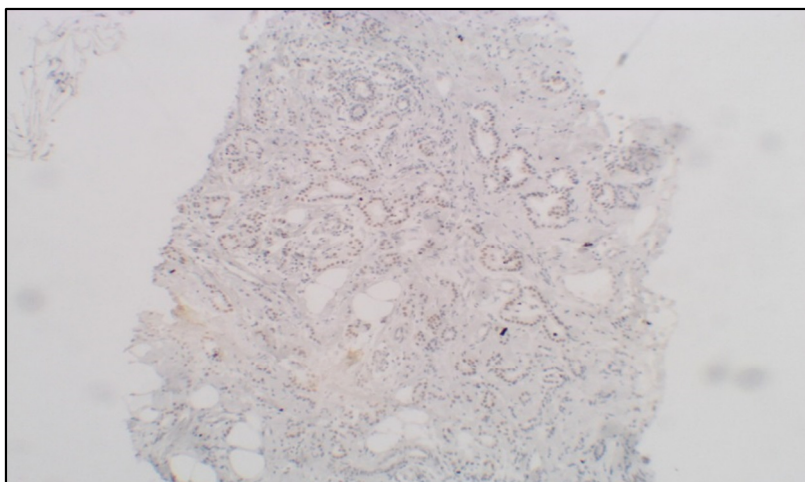


Figure 1 – Microscopic image of tumor tissue in breast cancer female patient with low expression of SIRT-1 (grade of 40% expression). Immunohistochemical technique. Increased 100x..

Font: The author (2016)

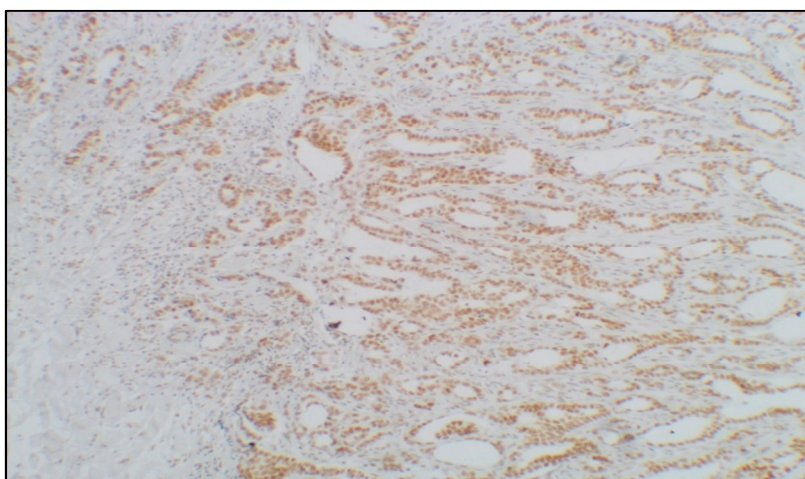


Figure 2 - Microscopic image of tumor tissue from breast carcinoma in female patients with moderate expression of SIRT-1 (grade of 70% expression). Immunohistochemical technique. Increased 100x.

Font: The author (2016)

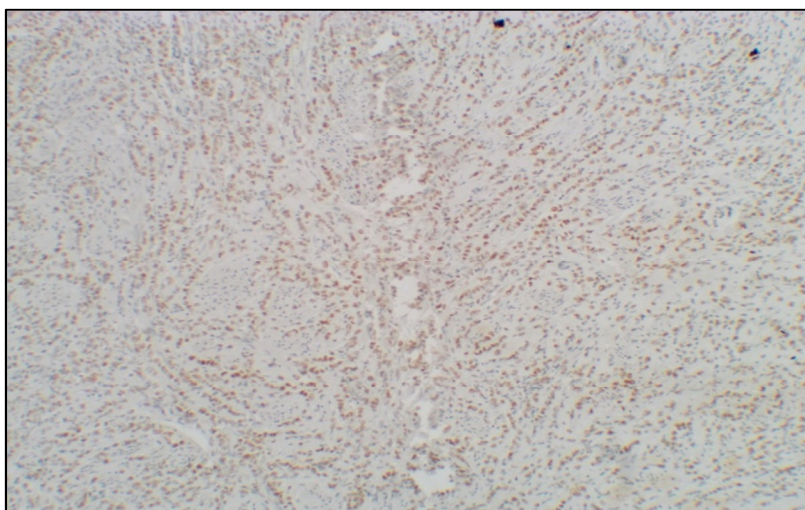


Figure 3 - Microscopic image of tumor tissue from breast carcinoma in female patients with moderate expression of SIRT-1 (grade of 70% expression). Immunohistochemical technique. Increased 100x.

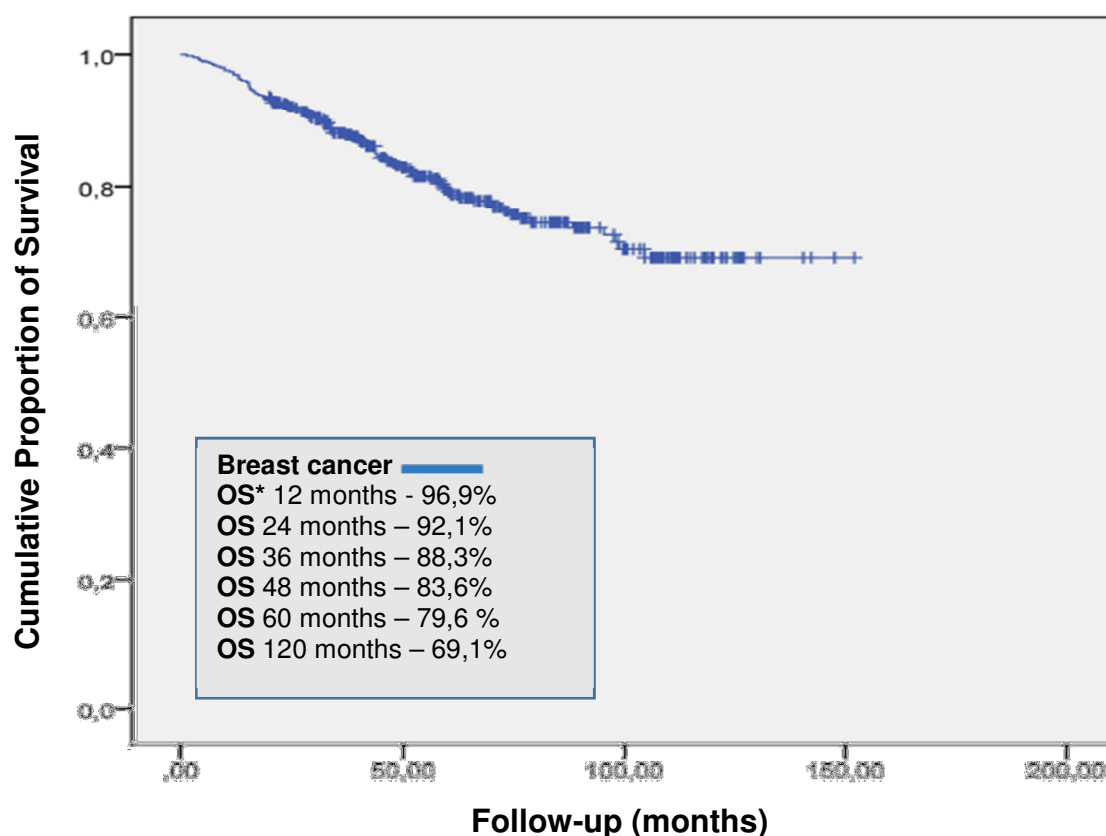
Font: The author (2016)

Table 7 - Description and frequency of variables studied in entry into cohort and events (deaths) occurred during the follow-up of patients.

Variables	Total n=457	Events (deaths)		
		%	n=93	%
Age range				
<50	149	32,6	21	14,9
50-59	115	25,2	16	13,9
60-69	90	19,7	21	23,3
≥70	103	22,5	35	34,0
Histology				
Invasive ductal	396	86,9	79	19,9
Invasive lobular	48	10,5	13	27,1
Mucinous	12	2,6	1	8,3
Tumor Size				
T1 (< 2 cm)	131	28,7	14	10,7
T2 (2 a 4,9 cm)	265	58,0	54	20,4
T3 (≥ 5 cm)	34	7,4	14	41,2
T4 (Inflammatory)	27	5,9	11	40,7
Axillary lymph nodes				
N0 (negatives)	225	49,2	30	13,3
N1 (<4 positive lymph nodes)	146	31,9	35	24
N2 (≥4 positive lymph nodes)	71	15,6	23	32,4
N3 (positive lymph nodes fused)	15	3,3	5	33,3
Metastasis				
Without	452	98,9	88	19,5
With	5	1,1	5	100
Staging (TNM)				
I	91	19,9	5	5,5
II	249	54,5	50	20,1
III	112	24,5	38	32,5
IV	5	1,1	5	100
Histologic grade				
Low	41	9,0	2	4,9
Intermediate	301	65,8	52	17,3
High	115	25,2	39	33,9
Estrogen receptor (ER)				
Negative	92	20,1	26	28,3
Positive	365	79,9	67	18,4
Progesterone receptor (PR)				
Negative	118	25,8	37	31,4
Positive	339	74,2	56	16,5
HER-2				
Negative	367	80,3	75	20,4
Overexpression	90	19,7	18	20
Ki-67 (proliferation index)				
Low	132	28,9	21	15,9
High	325	71,1	72	22,2
Molecular profile				
Luminal A	11	24,3	18	16,2
Luminal B HER-2 negative	216	47,3	41	19

Variables	Total n=457	Events (deaths)		
		%	n=93	%
Luminal B HER-2 positive	64	14,0	11	17,2
HER-2 Overexpression	26	5,7	7	26,9
Triple negative	40	8,8	16	40
Surgery				
Conservative	181	39,6	23	12,7
Radical	275	60,2	70	25,5
Not performed	1	0,2	1	100
Chemotherapy				
Not performed	117	25,6	23	19,7
Performed	340	74,4	70	20,6
Radiotherapy				
Not performed	168	36,8	34	20,2
Performed	289	63,2	59	20,4
Endocrine therapy				
Not performed	89	19,5	26	29,2
Performed	368	80,5	67	18,2
Herceptin® (anti-Her-2 target)				
Not performed	41	45,6	13	31,7
Performed	49	54,4	5	10,2
Censored				
Live	364	79,6		
Events				
deaths			93	20,4

Font: The author (2016)



Full cohort	Cases (n)	Deaths (n)	Deaths (%)	OS* (meses)	CI 95%	Kaplan-Meier Standard deviation:
Breast cancer	457	93	20,4	120,243	114,504 - 125,982	2,928

Figure 4 - Global survival curve specific disease (Kaplan-Meier) in months of patients with breast cancer during the follow-up of the cohort.

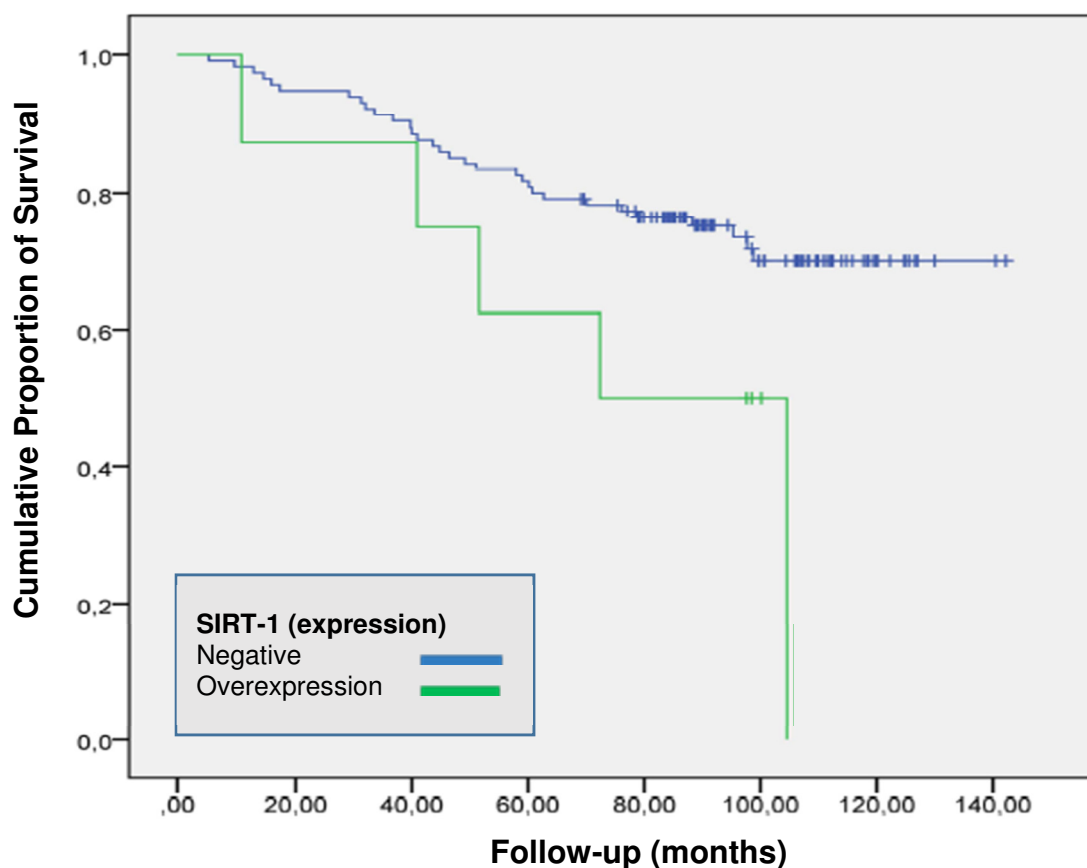
Font: The author (2016)

* OS: overall survival specific disease

Table 2 - Description of the grade of expression of the sirtuin-1 (SIRT-1) in patients with breast cancer and number of events (deaths) occurred during follow-up

Grade of expression SIRT-1	Total n=123		Events (Deaths) N=35	
		%		%
Negative expression (0)	9	7,3	3	33,3
Low expression (1+)	71	57,7	18	25,4
Moderate expression (2+)	35	28,5	9	25,7
Overexpression (3+)	8	6,5	5	62,5

Font: The author (2016)



SIRT-1	Cases (n)	Deaths (n)	Deaths (%)	OS (meses)	CI 95%	Log Rank X^2 : 4,452 p = 0,035
Negative	115	31	26,9	115,541	107,324 a 123,758	
Overexpression	8	5	62,5	74,221	47,735 a 100,707	

Figure 5 - Overall survival curves specific disease (Kaplan-Meier) months of the cohort of patients with breast cancer according to expression of sirtuin-1 (SIRT-1)

Font: The author (2016)

Table 3 - Univariate analysis of SIRT1 adjusted to occurrence of death according to the description of each prognostic variable in the cohort of female patients with breast cancer

Adjusted variables	HR*	CI 95%***	p ***
SIRT-1 unadjusted	2,66	(1,03 – 6,86)	0,043
Age	2,86	(1,11 – 7,38)	0,030
Histology	2,79	(1,07 – 7,28)	0,036
Tumor Size	1,92	(0,71 – 5,20)	0,198
Lymph nodes	2,73	(1,06 – 7,04)	0,037
TNM	2,25	(0,87 – 5,81)	0,096
Grade	1,87	(0,71 -4,92)	0,206
Her2	2,82	(1,07 -7,44)	0,036
Ki - 67	2,48	(0,95-6,42)	0,062

Adjusted variables	HR*	CI 95%***	p***
Estrogen receptor	2,42	(0,89 - 6,60)	0,085
Progesterone receptor	2,13	(0,79 – 5,73)	0,135
Molecular profile	2,47	(0,93 – 6,59)	0,071
Surgery	2,57	(1,00 - 6,62)	0,051
Chemotherapy	2,90	(1,11 – 7,60)	0,030
Radiotherapy	2,71	(1,05 – 7,01)	0,040
Endocrine therapy	2,18	(0,79 – 6,04)	0,134
Herceptin®	2,53	(0,98 – 6,54)	0,055

Font: The author (2016)

* *Hazard Ratio* (HR): obtained from the Cox model of proportional hazards adjusted for each variable

** Confidence interval

*** Statistical significance

Table 4 - Multivariate Analysis of SIRT-1 adjusted for the occurrence of death according to the grouped prognostic variables in specific models in the cohort of female patients with breast cancer

Models	HR*	IC 95%***	p***
SIRT-1 unadjusted	2,66	(1,03 – 6,86)	0,043
SIRT-1, age	2,86	(1,11 – 7,38)	0,030
SIRT-1, age, lymph nodes	3,58	(1,35 – 9,52)	0,011
SIRT-1, age, TNM, histological grade	2,27	(0,84 – 6,15)	0,108
SIRT-1, age, lymph nodes, Her-2, ki-67	3,82	(1,37–10,64)	0,010
SIRT-1, age, lymph nodes, hormone receptor	2,87	(0,97 – 8,48)	0,056
SIRT-1, age, lymph Nodes, molecular profile	3,44	(1,21 – 9,79)	0,021

Font: The author (2016)

* *Hazard Ratio* (HR): obtained from the Cox model of proportional hazards adjusted for each variable

** Confidence interval

*** Statistical significance

APÊNDICES

APÊNDICE A – INSTRUMENTO PARA COLETA DE DADOS

<p>Nome: _____</p> <p>NRLP (Número do registro Lab Patologia) : _____</p> <p>NRG (Número de registro geral) : _____</p> <p>AR (Ano de registro) : _____</p> <p>DTN (Data de nascimento) : _____</p> <p>I (idade) : _____</p> <p>P (Procedência) : _____</p> <p>HFC (Histórico ou antecedente familiar de câncer) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sim, câncer de mama 2. Sim, outro tipo de câncer 3. Não 4. Sem registro <p>R (raça) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Branca 2. Negra 3. Indígena 4. outra 5. Sem registro <p>V (vivo) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 3. Sem registro <p>DO (data do óbito) : _____</p> <p>CO (causa do óbito) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Relacionada ao câncer 2. Não relacionada ao câncer. Qual: _____ <p>DD (data do diagnóstico) : _____</p> <p>DPC (data da 1ª consulta) : _____</p> <p>DIT (data de início do tratamento) : _____</p> <p>DUC (data da última consulta) : _____</p> <p>TH (tipo Histológico) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Carcinoma Ductal Invasor 2. Carcinoma Lobular 3. Carcinoma Mucinoso 4. Carcinoma in situ 5. outro <p>EC (Estadiamento Clínico): TNM T ___ N ___ M ___</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estágio I 2. Estágio II 3. Estágio III 4. Estágio IV <p>T (Tamanho do tumor):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor < 1,0 cm 2. Tumor >1,0 <2,0 cm 3. Tumor >2,0 <5,0 cm 4. Tumor >5,0 cm 5. Tumor inflamatório 	<p>GRAU (Escore de Nottingham) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. baixo grau (G I) 2. médio grau (G II) 3. alto grau (G III,IV) <p>IAL (invasão anfiolinfática):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Presente 2. Ausente 3. Sem registro <p>LN (Status linfonodal):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Metástases 1 a 3 ln 2. Metástases 4 ou + 3. Sem Metástases <p>HER-2 (oncogene C-Erb2):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Her-2 : escore 3+ 2. Her-2 : escore 2+ 3. Her-2 : escore 1+ 4. Her-2 : escore NEGATIVO 5. Sem registro <p>RE (receptor estrogênio):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo 2. Negativo 3. Sem Registro <p>RP (receptor progesterona):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo 2. Negativo 3. Sem Registro <p>Ki-67 (Índice de proliferação celular):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo – escore > 14% 2. Positivo – escore < 14% 3. Negativo 4. Sem registro <p>P53 (proteína p 53):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo 2. Negativo 3. Sem Registro <p>TRi (Primeiro tratamento realizado) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. cirurgia 2. radioterapia 3. hormioterapia neo-adjuvante 4. quimioterapia neo-adjuvante 5. quimio + biológico neo-adjuvante 6. outro <p>PTR (procedimento realizados)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cir 2. Cir + Rxt 3. Cir+Htx 4. Cir+Rxt+Htx 5. Cir+Rxt+Htx+Qtx 6. Cir+Rxt+Htx+Qtx + Herc 7. Cir+Rxt+Htx+Cast+Qtx 8. Cir+Rxt+Htx+Cast+Qtx +Herc 9. Cir+Htx+Qtx +Herc 10. Cir+Htx+Qtx 11. Outra combinação de tratamento
---	--

<p>TApC (tratamento adjuvante pós cirurgia):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Não 2. Sim, Rxt 3. Sim, Htx 4. Sim, Qtx 5. Sim, Rtx + Htx 6. Sim, Rxt + Qtx 7. Sim, Rxt + Qtx + Herc 8. Sim, Rxt + Qtx + Htx 9. Sim,Rxt +Qtx +Htx+herc <p>Htx (hormonioterapia)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. tamoxifeno 2. megestrol 3. anastrozol 4. letrozol 5. fulvestranto 6. goserelina <p>Qtx (quimioterapia)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. CMF 2. AC 3. FAC 4. AC- T 5. FEC 6. QTx + herceptin 7. Outro esquema <p>DMtx (data da metástase) : _____</p> <p>SMtx (sítio ou local da metástase) :</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. sem metástase 1. osso 2. pulmão 3. figado 4. SNC 5. linfonodos 6. outro sítio 7. sem registo <p>MtxO (metástases ósseas - utilização de inibidor de osteólise):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não <p>SIRT-1 (Sirtuina 1):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Expressão alta: escore 3+ 2. Expressão baixa:escore 1 e 2+ 3. Sem Expressão: escore nulo 4. Sem registo 	
---	--

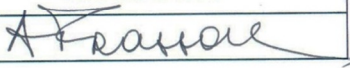
APÊNDICE B - TERMO DE CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS PESQUISADOS

**TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS E
COLETA DE DADOS DE PRONTUÁRIOS MÉDICOS PARA
PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

Título do Projeto: **EPIGENÉTICA – EXPRESSÃO DE SIRTUÍNA 1 (SIRT-1) E
PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA**

Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/2012 no desenvolvimento do projeto de pesquisa : EPIGENÉTICA – EXPRESSÃO DE SIRTUÍNA 1 (SIRT-1) E PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA, assim como afirmo que os dados descritos no protocolo serão obtidos em absoluto sigilo e utilizados apenas para os fins especificados no protocolo aprovado pelo Comitê de Ética /PUC.RS.

Erechim, 14 de outubro de 2013.

Nome do pesquisador orientador	ASSINATURA
1- ANTONIO LUIZ FRASSON	

Nome do pesquisador aluno	ASSINATURA
2- JULIANO SARTORI	