



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



GILMARA PÉRES RODRIGUES

**EXPRESSÃO GÊNICA DO LIV-1 (SLC39A6), POLIMORFISMO 3129 G>A NO
GENE IGF-1R E SUA INTERAÇÃO COM FATORES DIETÉTICOS E
ANTROPOMÉTRICOS EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

TERESINA

2019

GILMARA PÉRES RODRIGUES

**EXPRESSÃO GÊNICA DO LIV-1 (SLC39A6), POLIMORFISMO 3129 G>A NO
GENE IGF-1R E SUA INTERAÇÃO COM FATORES DIETÉTICOS E
ANTROPOMÉTRICOS EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito para obtenção do título de DOUTOR.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientadora:

Prof^a. Titular Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

Coorientador:

Prof. Titular Dr. Benedito Borges da Silva

TERESINA

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processos Técnicos

R696e Rodrigues, Gilmara Péres.
Expressão gênica do LIV-1 (SLC39A6), polimorfismo 3129 G>A
no gene IGF-1R e sua interação com fatores dietéticos e
antropométricos em mulheres com câncer de mama / Gilmara Péres
Rodrigues. -- 2019.
190 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste
de Biotecnologia (RENORBIO), Programa de Pós-Graduação em em
Biotecnologia, Teresina, 2019.

“Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nadir do Nascimento Nogueira.”

“Coorientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.”

1. Neoplasia mamária. 2. Zip6. 3. Proteína transportadora de zinco.
4. Variantes polimórficas. 5. Fatores de Crescimento. 6. Adiposidade
abdominal. I. Nogueira, Nadir do Nascimento. II. Silva, Benedito
Borges da. III. Título.

CDD 616.994 49

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Gilmara Péres Rodrigues

TÍTULO DO PROJETO: “Expressão gênica do LIV-1 (SLC39A6), polimorfismo 3129 G>A no gene IGF-1R e sua interação com fatores dietéticos e antropométricos em mulheres com câncer de mama.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Prof. Dr. Emídio Marques de Matos Neto - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz – UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>
Profa. Dra. Carla Soraya Costa Maia - UECE (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>[Assinatura]</u>

DATA DA AVALIAÇÃO: 04 de Outubro de 2019.

HORÁRIO: 14:30h

LOCAL: Auditório do Departamento de Enfermagem- CCS/UFPI.

Às mulheres que, diante do medo e da dor, enxugaram as lágrimas e doaram à ciência um pouquinho de si mesmas, na esperança de dias melhores para todos. Em especial, à memória de *Aldenice da Paz Santana dos Santos* e *Rosimaria Santos de Sousa*, que saudosamente partiram antes desses dias se tornarem realidade.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é uma das mais belas virtudes. Quando cultivada, traz alegria e leveza ao coração, aproximando-nos de Deus e uns dos outros. Agradecer é reconhecer. Reconhecer que não estamos sozinhos e que a independência nem sempre nos conduz pelo melhor caminho. Caminhos trilhados juntos podem parecer mais retos, até quando são tortuosos. Agradecer é, acima de tudo, reconhecer que a bondade de Deus se expressa no convívio, na comunhão diária com o Eterno e com aqueles que Ele criou. Bondade e graça expressos nas pessoas que conhecemos, em nós, por meio delas e por nós, para o bem de todos.

Como disseram certa vez: *“até aqui nos ajudou o Senhor”*, reconheço que Deus é meu auxílio e mantenedor. Em Sua força, cheguei a este momento. Sou imensamente grata por Seu cuidado, bondade e providências. Não há nada melhor nesta vida do que a certeza do Seu amor misericordioso. Obrigada, Deus Único e Criador, porque as Tuas misericórdias se renovam a cada manhã. Obrigada por ouvir as orações, por me amar e compreender, por me apoiar em todos os momentos e por me capacitar a realizar Teus sonhos para mim.

Reconheço o amor dos meus pais, Glória e Genésio, o carinho e cuidado, sempre presentes. A torcida que não falha. Eles são os que têm a melhor expectativa a meu respeito. O amor de vocês é bálsamo para o meu coração. O apoio de vocês é refúgio em dias de adversidade, é porto seguro. Obrigada pela compreensão de minhas ausências, pela paciência e ansiedade por estarmos juntos. Obrigada pelas orações, por cada prece dirigida ao Senhor em prol da minha vida e bem-estar. Obrigada, mamãe e papai, porque vocês são exemplo e inspiração, combustível para perseverar. Tudo o que hoje sou, tem a contribuição de vocês. Obrigada por tanto!

Aqui, estendo minha gratidão, ao carinho, orações e compreensão das minhas irmãs (Socorro e Geysha), sogros (Nida e Edilson), sobrinhos (George, Keyluce, Keylane, Matheus, Ana Calista, José Neto, Pedro Henrique, Isaac e Clara) e cunhados (Elda, Leonardo, Alice, José Roberto e Carlos). Reconheço que cada um está sempre na torcida por meu êxito. O amor, carinho e a confiança que me transmitem é fonte de motivação para ir cada dia mais longe. Amo muito vocês!

Reconheço, com muita gratidão no coração, todo o incentivo, compreensão, amor e dedicação do meu esposo, Edilson Júnior. Sua contribuição para obtenção deste título acadêmico é imensurável. Todos os dias ao meu lado, todos os dias me motivando e sendo o

alicerce do nosso lar, para que eu pudesse me dedicar a realizar mais este sonho. Assim como no mestrado, foram muitos conselhos parecidos com reclamações (rs), muitas idas aos laboratórios, muitos finais de semana e férias “sacrificados”, muitos anseios de que eu concluísse logo essas atividades. Sinto-me amada por Deus, pelo simples fato de você existir na minha vida. Obrigada por ser quem és.

Reconheço que este doutoramento não seria possível, não fosse a confiança, dedicação, exemplo, maestria, competência e zelo de uma pessoa que, na convivência acadêmica ao longo de 14 anos, aprendi a admirar, respeitar e imitar (rs): minha amada orientadora, Professora Dra. Nadir Nogueira. Faltam palavras para agradecer tudo o que me ensinastes, por exemplo e por palavras, por sua conduta ética, ilibada e diplomática, sempre bem-humorada. Obrigada, professora querida, por todos os momentos juntas, pelo carinho, amizade, compreensão, paciência, apoio e ensinamentos mil! És exemplo para mim, de pesquisadora e profissional excepcional, que busca excelência em tudo o que faz. Obrigada pela imensurável contribuição em minha formação pessoal e acadêmica. Tens lugar cativo em meu coração.

Reconhecimento ao apoio e contribuição científica do meu coorientador, Professor Dr. Benedito Borges. *Expertise* em mastologia e câncer de mama, com ele comecei a caminhada pelos mistérios da carcinogênese mamária. Sou grata pela oportunidade e dedicação. Obrigada pela generosidade com que me acolheu, mesmo antes de me conhecer, e pelos ensinamentos acadêmico-científicos de grande valor, que certamente acompanharão minha vida profissional.

Reconheço que muito aprendi com a querida Professora Dra. Socorro Cruz. Descobri, que além da inteligência, ela é dona de um grande e sábio coração. Meus anseios para aprender as técnicas laboratoriais de biologia molecular começaram a ser satisfeitos com seus ensinamentos, quando tão gentilmente, não apenas me ensinou a extrair DNA, como acolheu-me carinhosamente em seu grupo de pesquisa. A partir desse momento, tive a oportunidade de conhecer o grupo de pesquisa mais alegre e disposto a compartilhar conhecimentos de toda a minha vida acadêmica! Nesse grupo, fui ensinada e auxiliada por todos e construímos, juntos, amizades que guardarei para sempre. Gratidão também por ter aceitado participar dessa banca e examinar o trabalho nas etapas de qualificação e defesa.

Extrair o DNA era apenas o princípio das muitas análises necessárias. Então, reconheço que os passos seguintes foram possíveis pelo auxílio e orientações do Dr. Vladimir Silva. Sou grata pela paciência, ensinamentos sobre as análises de polimorfismo e expressão gênica, auxílio em todas as etapas, incluindo a supervisão das técnicas, controle de qualidade e

entendimento dos dados. Sou muito grata pela parceria, generosidade, disposição de ensinar e de providenciar aquilo que é necessário. Obrigada, também, por aceitar avaliar este trabalho.

Meu reconhecimento e gratidão também se estendem aos professores: Dr. João Marcelo Sousa, pela amizade, parceria de pesquisa e prontidão em nos auxiliar, aceitando participar desta defesa e examinar o trabalho, de forma a contribuir com seus conhecimentos em biologia molecular para melhoria do mesmo; Dra. Rafaella Luna, pelo carinho e amizade com que recebeu o convite para avaliar este trabalho, nas etapas de qualificação e defesa, contribuindo para seu aperfeiçoamento; e ao Dr. Paulo Michel Ferreira, por ter presidido a banca de qualificação e pelas sugestões que enriqueceram nosso trabalho.

Gratidão ao Prof. Emídio Matos, pela parceria de pesquisa, por sua disponibilidade em ajudar e compartilhar conhecimentos sobre a extração do RNA e síntese da biblioteca de cDNA. Obrigada pelo auxílio técnico e generoso empréstimo do conjunto de pipetas, que tornaram as muitas e pequenas pipetagens menos cansativas e mais precisas. E, principalmente, muito obrigada pela amizade de muitos anos, pela humanidade, dedicação e empenho no exercício da nossa profissão. Agradeço, meu amigo, e reconheço que a energia e alegria que você transmite são motivação e esperança durante esses dias de luta. Obrigada, também, por aceitar participar da banca e pelas contribuições para aperfeiçoamento do trabalho.

Minha gratidão também se estende à Dra. Carla Soraya, pela gentileza e disponibilidade com que aceitou participar da defesa deste trabalho. Sua presença nessa banca tem um significado especial, tanto pela alegria e carinho transmitidos, *expertise* e competência profissional na área de Nutrição, como também pelas boas lembranças de sua participação em minha defesa de mestrado. Pode até parecer coincidência, mas gosto de acreditar na providência cuidadosa de Deus. É uma felicidade tê-la em mais esse momento importante da minha formação acadêmica. Obrigada por examinar este trabalho e pelas importantes contribuições!

Reconheço, ainda, que a bondade de Deus para comigo se expressa todos os dias pela vida de amigos e parceiros de pesquisa, que muito contribuíram para a realização deste trabalho: (1) Victor Oliveira, mão ajudadora nas análises, busca de artigos e recrutamento de participantes. A convivência nos tornou amigos, aluno e professor. Meu muito obrigada por todo auxílio e empolgação constante! (2) Regina Cavalcante, parceira de laboratório, de ácido nítrico e dos critérios para controle de qualidade, provavelmente nós duas temos “TOC” científico (rs). Seu coração bondoso e especificidades que a tornam única, me fazem grata por tê-la comigo nessa caminhada, és uma querida amiga; (3) Dr. Sabas Carlos, principal responsável pelo alcance do tamanho amostral. Sua conduta imparcial e comprometida,

auxiliou-me grandemente, além de compartilhar ciência e estimular a produção científica. Muito obrigada! (4) Professor Dr. Moita-Neto, sou muito grata por sua disposição e dedicação em “*ensinar-me a pescar*”. Seus ensinamentos e conselhos científicos fundamentam meus conhecimentos em estatística e são fonte de inspiração; (5) Beatriz Araújo, gratidão especial a você, que acrescentou força ao trabalho, auxiliando-me em todas as etapas da coleta de dados, especialmente na avaliação do consumo alimentar; (6) Maísa Guimarães, gratidão pelo auxílio na busca de artigos atuais sobre obesidade no câncer de mama, bem como na obtenção de informações clínicas e laudos de exames das pacientes em acompanhamento; (7) Thaís Nogueira, reconheço que seu auxílio foi de grande valor na obtenção de informações científicas para atualizar e sistematizar a revisão de literatura. Obrigada pelo carinho, sempre presente, e por ser motivação, mesmo sem perceber; (8) Vanessa Brito, obrigada por estar comigo em muitos domingos no Laboratório de Nutrição Experimental, processando as amostras biológicas. Nossa convivência nos permitiu romper o vínculo *orientando - professor* e desenvolver uma amizade sólida. Obrigada por ser amiga em todas as horas e estar sempre disponível para ajudar.

Gratidão especial à minha “*partner*” Daniele Caldas. Nossa “*sociedade*” iniciou quando meu estudo de mestrado contemplava sua pesquisa de iniciação científica, e hoje, se consolida em nossos doutoramentos para além das fronteiras acadêmicas. Junto com a parceira de pesquisa ganhei também uma grande amiga, uma pessoa especial para guardar no coração, companheira, presente, sincera e amável. Amiga, sou grata à Deus pela nova oportunidade que tivemos de conviver e nos conhecermos. Obrigada por tudo! Sua amizade e companhia durante todas as etapas da pesquisa foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Assim, meu coração se enche de gratidão pelas amizades construídas durante esses quatro anos de doutoramento, no compartilhar das aflições de um doutorando e na convivência do laboratório. Aos grupos de pesquisa em: *Nutrição Experimental, linha de pesquisa em Obesidade*, coordenado pela Professora Dra. Dilina Marreiro; *Imunologia Veterinária*, coordenado pela Professora Dra. Socorro Cruz; *Mastologia, linha de pesquisa em Câncer de Mama*, coordenado pelo Professor Dr. Benedito Borges; e *Leishmanioses*, coordenado pelos professores Dr. Carlos Henrique Nery, Dra. Dorcas Lamounier e Dr. Vladimir Silva. Em especial aos amigos: Alessandra, Bárbara Verônica, Carla Escórcio, Camila Revoredo, Luana Mota, Fabiane Sampaio, Danylo, Conceição, Diana Stefany, Thayanne Gabryelle, Mickael Sousa, Jennifer, Stéfanye, Loanne, Ana Raquel, Kyria, Kátia Carvalho, Nauside, Débora Braz, Amanda Miranda, Mízia Joyner, Rebeca Mavignier. Michelle Lopes, Emille Andrade, Nathália

Andrade, Renata Vieira, Viviane e Teresinha, Aline Moreira, Ítalo Gomes, Amanda Tavares, Leopoldo Marçal e Felipe.

Meu reconhecimento a todos aqueles que, direta ou indiretamente, muito me ajudaram e fortaleceram nessa caminhada, seja no ato de aceitar integrar esse estudo, comprometendo-se em transmitir todos os muitos dados coletados, ou na torcida, amizade, compreensão das minhas muitas ausências, ofertas de auxílio e carinho, como o fizeram minha querida prima Lílian Rodrigues e os *simplesmente amigos*, Tauani, Osmar e Ivan Cardoso. Vocês moram em meu coração, são acolhida e apoio constante. Agradecimento especial à amiga Poliana Fonseca. Sua alegria, incentivo, dicas e motivações constantes são parte desta vitória. Obrigada pelo convívio agradável, por torcer tanto pela defesa, por ser parceira e generosa! Minha gratidão também à querida Camila Guedes, pela dedicação, companheirismo, amizade, competência e auxílio. Meu reconhecimento à bondade e acolhida em família, que me foram de grande valia nessa etapa final.

Gratidão, também, aos professores do Departamento de Nutrição, aqui representados pelos amigos Dra. Socorro Alencar, Dra. Adriana Paiva, MS. Mercês Luz, Dra. Vanessa Lima, Dra. Betânia Freitas, Dra. Dilina Marreiro, Dra. Suely Santiago, Mestre Gilvo Farias e Dra. Karolinne Frota, que viabilizaram meu afastamento exclusivo no último ano de doutorado e distribuíram entre si as minhas atividades docentes. É, também, por contribuição de vocês que cheguei até aqui!

Minha gratidão se estende também à Larysse Maira, estagiária docente, ex-aluna e amiga, cujo auxílio na disciplina Dietoterapia 1, por ocasião do meu retorno às atividades acadêmicas, viabilizou a realização das últimas análises laboratoriais e a concretização do trabalho em sua versão final. Reconheço o cuidado e bondade de Deus na dedicação, responsabilidade, criatividade e competência com que você desenvolveu suas atividades no estágio docente. Muito obrigada!!

Não poderia deixar de mencionar e reconhecer a compreensão e torcida dos meus alunos queridos, aqui representados pela Éllen Maria, Paula Fernanda, Thamara Martins, Vanessa Germana e Gleyson Moura. Mesmo sem saber, cada um deles é motivação sempre presente para vencer todos os obstáculos e alcançar a excelência na formação acadêmica.

Reconheço, assim, que esse trabalho é fruto de muitas mãos. Impossível seria tê-lo realizado sem as contribuições mencionadas e sem a participação de tantos outros, cujos nomes não estão escritos nestas páginas. Muitíssimo obrigada por sonharmos juntos, pois agora esse sonho é REALIDADE!

*“Lindas rosas a toda mulher, ...
Que em seu peito durma alegria,
Na certeza de uma dor ausente.
Que o câncer não seja companhia,
Mesmo se ele se mostrar latente”*

(Outubro Rosa, Luso Poemas)

RESUMO

Carcinomas são tumores malignos constituídos por células de crescimento desordenado e capacidade invasiva que requerem elevadas concentrações intracelulares de zinco (Zn) para manutenção do índice mitótico. O LIV-1 (Zip6) é uma das principais proteínas transportadoras de influxo de Zn^{2+} , com superexpressão associada à agressividade tumoral e invasão para gânglios linfáticos na neoplasia mamária. O gene codificador do LIV-1 (SLC39A6) é induzido por estrógenos, com mecanismos de ativação que incluem a fosforilação de proteínas quinases, entre as quais o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R). Polimorfismos no gene IGF-1R estão associados à superexpressão do receptor, mas sua influência no câncer de mama permanece controversa. Este estudo objetivou avaliar a expressão gênica do LIV-1 (SLC39A6), o polimorfismo 3129 G>A no gene IGF-1R e sua interação com fatores dietéticos e antropométricos em mulheres com câncer de mama. Realizou-se uma revisão sistemática sobre o potencial funcional de polimorfismos no gene IGF-1R na neoplasia mamária, selecionando-se estudos originais, sem limite de ano ou idioma de publicação. Em adição, desenvolveu-se estudo caso-controle em 136 mulheres com (n = 66) e sem câncer de mama (n = 70). Os dados referentes aos fatores de risco para neoplasia mamária, estadiamentos anatômico e de prognóstico clínico foram obtidos, respectivamente, por entrevista estruturada e consulta aos exames. Determinantes dietéticos e antropométricos foram avaliados conforme parâmetros vigentes. A genotipagem do SNP rs2229765 e a expressão gênica do LIV-1 foram determinadas por PCR em tempo real. Testes estatísticos específicos às variáveis estudadas foram aplicados, considerando-se significativos valores de $p < 0,05$. A revisão sistemática mostrou que polimorfismos no gene IGF-1R têm potencial funcional no câncer de mama, associando-se ao risco e prognóstico clínico da doença. Referente às mulheres avaliadas, verificou-se que o carcinoma ductal invasivo, luminal B, foi o principal tipo de tumor encontrado, com estadiamento 0 a IIb da classificação TNM (tumor-linfonodo-metástase). Mulheres com câncer de mama apresentaram maior ingestão dietética e adiposidade abdominal em comparação àquelas sem a doença. A distribuição alélica do SNP rs2229765 não foi associada com o câncer de mama e expressão gênica do LIV-1, independentemente do estado menopausal. Porém, risco aumentado para o desenvolvimento da doença foi identificado em mulheres com excesso de adiposidade abdominal e genótipo AA. Verificou-se maior abundância do mRNA do LIV-1 em mulheres com câncer de mama, associada inversamente à metástase de gânglios linfáticos. Além disso, encontrou-se associação positiva entre a expressão

gênica do LIV-1, adiposidade abdominal e idade ao diagnóstico da doença. Conclui-se que o potencial funcional do SNP rs2229765 no câncer de mama pode se modificar na presença do excesso de tecido adiposo abdominal. A expressão gênica do LIV-1 também pode ser influenciada pela adiposidade abdominal, estando associada a tumores menos agressivos e de melhor prognóstico clínico nas mulheres com câncer de mama.

Palavras-chave: Neoplasia mamária. Zip6. Proteína transportadora de zinco. Variantes polimórficas. Fatores de Crescimento. Adiposidade abdominal.

ABSTRACT

Carcinomas are malignant tumors consisting of disordered growth and highly invasive cells that require high intracellular zinc (Zn) concentrations to maintain the mitotic index. LIV-1 (Zip6) is one of the major Zn²⁺ influx carrier proteins, which the overexpression is associated with tumor aggressiveness and invasion to lymph nodes in breast cancer. The LIV-1 coding gene (SLC39A6) is estrogen-induced, with activation mechanisms include protein kinases phosphorylation, and into those is the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R). Polymorphisms in the IGF-1R gene are associated with receptor overexpression, but its influence on breast cancer remains controversial. The aim of this study is to evaluate the gene expression of LIV-1 (SLC39A6), the 3129 G>A polymorphism in the IGF-1R gene and its interaction with dietary and anthropometric factors in women with breast cancer. We performed a systematic review on the functional potential of IGF-1R gene polymorphisms in breast cancer, selecting original studies with no year or language limit of publication. In addition, a case-control study was developed in 136 women with (n = 66) and without breast cancer (n = 70). Data regarding risk factors for breast cancer, anatomical staging and clinical prognosis were obtained, respectively, by structured interview and examination consultation. Dietary and anthropometric determinants were evaluated according to current parameters. The genotyping of the rs2229765 SNP and LIV-1 gene expression were determined by real-time PCR. Statistical tests specific to the variables analyzed were applied, considering significant values of $p < 0.05$. The systematic review showed that IGF-1R gene polymorphisms have functional potential in breast cancer, with inconclusive results on their influence on different molecular types of the disease and menopausal status. Referring to the women evaluated, it was shown that invasive ductal carcinoma, luminal B, was the main type of tumor found, with stage 0 to IIb of the classification TNM (tumor-node-metastasis). Women with breast cancer had higher dietary intake and abdominal adiposity compared to those without the disease. Allelic distribution of rs2229765 SNP was not associated with breast cancer and LIV-1 gene expression, regardless of menopausal status. However, increased risk for disease development has been identified in women with excess abdominal adiposity and AA genotype. More abundance of LIV-1 mRNA was found in women with breast cancer, inversely associated with lymph node metastasis. In addition, a positive association was found between LIV-1 gene expression, abdominal adiposity and age at the diagnosis of the disease. In conclusion the functional potential of rs2229765 SNP in breast cancer may change in the presence of excess abdominal adipose tissue. LIV-1 gene

expression may also be influenced by abdominal adiposity, being associated with less aggressive tumors and better clinical prognosis in women with breast cancer.

Keywords: Breast cancer. Zip6. Zinc carrier protein. Polymorphic variants. Growth Factors. Abdominal adiposity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1.	Etapas de iniciação, promoção e progressão na carcinogênese mamária.	28
Figura 2.	Esquema ilustrativo da absorção do Zn alimentar.	35
Figura 3.	Esquema ilustrativo da atividade do LIV-1 (SLC39A6) na proliferação, invasão e metástase tumoral.	39
Figura 4.	Estrutura heterotetramérica do IGF-1R e seus principais ligantes.	40
Figura 5.	Transdução do sinal do IGF-1R ativado.	41

CAPÍTULO 1

Figura 1.	Fluxograma de seleção dos estudos sobre polimorfismos no gene IGF-1R em mulheres com câncer de mama.	65
------------------	--	----

CAPÍTULO 2

5.2.2.1	RESUMO GRÁFICO	95
----------------	-----------------------	----

CAPÍTULO 3

Figura 1.	Fluxograma de arrolamento das mulheres incluídas no estudo.	123
Figura 2.	Distribuição das mulheres com e sem câncer de mama, segundo valores de referência da ingestão do Zn.	142
Figura 3.	Expressão gênica do LIV-1 em relação ao gene constitutivo 18S nas mulheres com e sem câncer de mama. (A) Razão LIV-1/18S ($2^{-\Delta CT}$), (B) Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação em RT-PCR dos genes 18S e LIV-1.	143
Figura 4.	Associação entre expressão gênica do LIV-1/18S ($2^{-\Delta CT}$) e agressividade do câncer de mama.	145

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1.	Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama.	32
------------------	---	----

CAPÍTULO 1

Tabela 1.	Caracterização dos estudos e das mulheres com e sem câncer de mama.	67
Tabela 2.	Associação entre polimorfismos no gene IGF-1R e câncer de mama, nos estudos incluídos na revisão sistemática.	70
Tabela 3.	Julgamentos dos autores para cada domínio de avaliação da qualidade metodológica, conforme proposto pela Escala Newcastle-Ottawa para estudos observacionais.	75
Tabela 4.	Resumo do risco de viés do estudo intervencional. Julgamentos dos autores para cada item de risco de viés, conforme proposto pela ferramenta de Colaboração Cochrane.	76
Tabela 5.	Características dos polimorfismos no gene IGF-1R associados ao câncer de mama, nos estudos incluídos nesta revisão sistemática.	78

CAPÍTULO 2

Tabela 1.	Identificação dos códigos genéticos e SNP utilizados no ensaio TaqMan® Source Life Technologies.	100
Tabela 2.	Caracterização das mulheres, segundo fatores de risco para o câncer de mama e grupos de estudo.	103
Tabela 3.	Caracterização clínica das mulheres com câncer de mama.	104
Tabela 4.	Ingestão dietética de energia, macronutrientes, fibras e colesterol por mulheres com e sem câncer de mama.	106
Tabela 5.	Distribuição do genótipo 3129 G>A no gene IGF-1R nas mulheres investigadas e associação com o risco de câncer de mama, segundo estado menopausal.	107

Tabela 6.	Razão de chances e intervalos de confiança para câncer de mama em mulheres com adiposidade abdominal, segundo SNP 3129 G>A no gene IGF-1R.	108
------------------	--	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 1.	Resumo esquematizado da caracterização anatômica dos carcinomas mamários, segundo estádios TNM.	125
Tabela 2.	Classificação dos subtipos moleculares do câncer de mama, segundo expressão do Ki67, receptores de estrogênio, progesterona e do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2.	126
Tabela 3.	Classificação do estado nutricional pelo IMC (Kg/m ²) para mulheres adultas e idosas.	127
Tabela 4.	Classificação do risco metabólico, segundo nível de adiposidade abdominal em mulheres brasileiras maiores de 18 anos.	128
Tabela 5.	Estimativa da composição corporal de mulheres a partir de 20 anos.	129
Tabela 6.	Identificação dos códigos genéticos e SNP utilizados no ensaio TaqMan [®] Source Life Technologies.	132
Tabela 7.	Genótipos e frequências alélicas do polimorfismo IGF-1R 3129 G>A (rs2229765) nas mulheres (n = 56).	135
Tabela 8.	Características tumorais relativas ao estadiamento anatômico e de prognóstico clínico nas mulheres com câncer de mama, segundo genótipos do polimorfismo IGF-1R 3129 G>A.	136
Tabela 9.	Descrição das características reprodutivas, clínicas e sociodemográficas das mulheres com e sem câncer de mama (n = 60).	137
Tabela 10.	Indicadores de adiposidade corporal e de estilo de vida das mulheres com e sem câncer de mama (n = 60).	139
Tabela 11.	Ingestão dietética de energia, macronutrientes, fibras, colesterol e Zn das mulheres com e sem câncer de mama (n = 51).	141
Tabela 12.	Correlações entre idade ao diagnóstico do câncer de mama, indicadores de adiposidade abdominal, ingestão dietética e abundância do mRNA do LIV-1/18S (2 ^{-ΔCT}).	147

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGS / AGM / AGP – Ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados

AMDR - Níveis de distribuição aceitável de macronutrientes

BRCA1 / BRCA2 – Genes de câncer de mama 1 e 2

CAAE - Certificado de apresentação para apreciação ética

CEP - Comitê de ética em pesquisa

CC - Circunferência da cintura

CHO - Carboidratos

CKcal – Percentual de contribuição calórica

CLT – Colesterol

CP – Circunferência do pescoço

CQ – Circunferência do quadril

EAR – Necessidade média estimada

ELSA - BRASIL – Estudo longitudinal de saúde do adulto, no Brasil

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

FNB – Conselho de alimentação e nutrição

GSK-3 β - Glicogênio sintase quinase-3 beta

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC - Intervalo de confiança

ICON – Índice de conicidade

IL-6 – Interleucina 6

IOM – Instituto de medicina

GC / GV – Gordura corporal / Gordura visceral

HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2

IGF – Fatores de crescimento semelhante à insulina

IGF-1 / IGF-2 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipos 1 e 2

IGF-1R – Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IMC – Índice de massa corporal

Kcal - Quilocalorias

Ki67 – Indicador nuclear de proliferação celular

LIV-1 (Zip6) – Proteína transportadora de influxo de zinco, membro 6

LPD – Lipídeos totais

MAPK / ERT – Proteína quinase mitógeno-ativada / quinases reguladas por sinal extracelular

MCF-7 – Linhagem celular de carcinoma de mama humano, ductal invasivo, metastático

MLG – Massa livre de gordura

qPCR – Reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa

QSQFA – Questionário semi-quantitativo de frequência alimentar

PI3K / AKT – Fosfatidilinositol-3-kinase / proteína quinase b

RCCQ – Razão circunferências da cintura e quadril

RCE – Razão cintura estatura

RDA – Ingestão dietética recomendada

RE / RP – Receptor de estrogênio / Receptor de progesterona

RH – Receptor hormonal

rs – Número de identificação do SNP

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SBAN – Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição

SKBR3 / BT474 / MDA231 – Linhagem celular de câncer de mama humano, ductal invasivo

SLC39A6 – gene codificador da proteína LIV-1

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

SPSS – Pacote estatístico para ciências sociais

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos

TD47 – Linhagem celular de carcinoma de mama humano, ductal invasivo, metastático

TGF- α – Fator de crescimento transformante alfa

TNBC – Tumor de câncer de mama triplo negativo

TNM – Tumor - Linfonodo - Metástase

3'-UTR – Região reguladora não traduzida

Zn / ZnT / Zip – Zinco / Família de transportadores de efluxo de Zn / Família de transportadores de influxo de Zn

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
2.1	Câncer de mama: epidemiologia, fisiopatologia e fatores de risco.....	26
2.2	Subtipos moleculares do câncer de mama.....	30
2.3	Zinco: aspectos bioquímicos e metabólicos.....	33
2.4	LIV-1 (Zip6) e carcinogênese mamária.....	37
2.5	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 tipo 1 (IGF-1R).....	40
2.5.1	<i>Aspectos estruturais e funcionais do IGF-1R.....</i>	<i>40</i>
2.5.2	<i>Expressão do IGF-1R na carcinogênese mamária.....</i>	<i>42</i>
	REFERÊNCIAS.....	45
3	OBJETIVOS.....	54
3.1	Objetivo geral.....	54
3.2	Objetivos específicos.....	54
4	PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO DA TESE.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	<u>CAPÍTULO 1</u>	57
5.1.1	TÍTULO.....	58
5.1.2	RESUMO.....	59
5.1.3	INTRODUÇÃO.....	60
5.1.4	METODOLOGIA.....	62
5.1.4.1	<i>Revisão da literatura e estratégia de busca.....</i>	<i>62</i>
5.1.4.2	<i>Seleção dos estudos e extração dos dados.....</i>	<i>62</i>
5.1.4.3	<i>Avaliação da qualidade e risco de viés.....</i>	<i>63</i>
5.1.4.4	<i>Análises.....</i>	<i>64</i>
5.1.5	RESULTADOS.....	65
5.1.5.1	<i>Artigos selecionados.....</i>	<i>65</i>
5.1.5.2	<i>Caracterização dos estudos.....</i>	<i>66</i>
5.1.5.3	<i>Avaliação da qualidade e risco de viés.....</i>	<i>74</i>
5.1.5.4	<i>Polimorfismos no gene IGF-1R e câncer de mama.....</i>	<i>77</i>
5.1.6	DISCUSSÃO.....	79
5.1.7	CONCLUSÃO.....	84

	REFERÊNCIAS.....	85
	APÊNDICE A - MATERIAL COMPLEMENTAR 1.....	90
5.2	<u>CAPÍTULO 2</u>	92
5.2.1	TÍTULO.....	93
5.2.2	RESUMO.....	94
5.2.2.1	RESUMO GRÁFICO.....	95
5.2.3	INTRODUÇÃO.....	96
5.2.4	METODOLOGIA.....	98
5.2.4.1	<i>Protocolo do estudo.....</i>	98
5.2.4.2	<i>Fatores de risco e estadiamento tumoral.....</i>	98
5.2.4.3	<i>Avaliação antropométrica.....</i>	98
5.2.4.4	<i>Avaliação da ingestão dietética.....</i>	99
5.2.4.5	<i>Extração do DNA genômico.....</i>	99
5.2.4.6	<i>Genotipagem do SNP rs2229765.....</i>	99
5.2.4.7	<i>Análises estatísticas.....</i>	100
5.2.4.8	<i>Aspectos éticos.....</i>	101
5.2.5	RESULTADOS.....	102
5.2.5.1	<i>Caracterização das participantes do estudo.....</i>	102
5.2.5.2	<i>Ingestão dietética habitual.....</i>	105
5.2.5.3	<i>Polimorfismo 3129 G>A e sua associação com o câncer de mama.....</i>	106
5.2.6	DISCUSSÃO.....	109
5.2.7	CONCLUSÃO.....	112
	REFERÊNCIAS.....	113
5.3	<u>CAPÍTULO 3</u>	118
5.3.1	TÍTULO.....	119
5.3.2	RESUMO.....	120
5.3.3	INTRODUÇÃO.....	121
5.3.4	METODOLOGIA.....	123
5.3.4.1	<i>Protocolo do estudo.....</i>	123
5.3.4.2	<i>Estadiamentos anatômico e de prognóstico clínico.....</i>	124
5.3.4.3	<i>Características reprodutivas, clínicas, sociodemográficas e estilo de vida</i>	126
5.3.4.4	<i>Avaliação antropométrica.....</i>	126
5.3.4.5	<i>Avaliação da ingestão dietética habitual.....</i>	129

5.3.4.6	<i>Colheita de material biológico e extração do DNA.....</i>	131
5.3.4.7	<i>Genotipagem do SNP 3129 G>A no gene IGF-1R.....</i>	131
5.3.4.8	<i>Análise da expressão gênica do LIV-1.....</i>	132
5.3.4.9	<i>Análises estatísticas.....</i>	134
5.3.5	RESULTADOS.....	135
5.3.5.1	<i>Genótipos do SNP 3129 G>A o gene IGF-1R.....</i>	135
5.3.5.2	<i>Estadiamentos anatômico e de prognóstico clínico.....</i>	135
5.3.5.3	<i>Fatores de risco, antropométricos e ingestão dietética habitual.....</i>	136
5.3.5.4	<i>Expressão gênica do LIV-1 e associação com agressividade tumoral.....</i>	142
5.3.5.5	<i>Relação entre fatores de risco e expressão gênica do LIV-1.....</i>	146
5.3.6	DISCUSSÃO.....	148
5.3.7	CONCLUSÃO.....	152
	REFERÊNCIAS.....	153
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	158
	ANEXOS.....	159
	APÊNDICES.....	179