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

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA METALOTIONEÍNA-1 EM MULHERES COM CARCINOMA MAMÁRIO

FABIANE ARAÚJO SAMPAIO

TERESINA
2019

RENORBIO-REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

Fabiane Araújo Sampaio

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA METALOTIONEÍNA-1 EM MULHERES COM CARCINOMA MAMÁRIO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Focal Piauí como pré-requisito para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes diagnósticos

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Serviço de Processamento Técnico

S192e Sampaio, Fabiane Araújo.
Expressão da proteína metalotioneína-1 em mulheres com carcinoma mamário / Fabiane Araújo Sampaio. – 2019.
99 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
"Orientador Prof. Dr. Benedito Borges da Silva".

1. Câncer de Mama. 2. Fibroadenoma. 3. Metalotioneína. 4. p53. 5. Zinco. I. Título.

CDD 616.992 49

renorbio
rede nordeste de biotecnologia

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Fabiane Araújo Sampaio

TÍTULO DO PROJETO: "EXPRESSÃO DA PROTEÍNA METALOTIONEÍNA-1 EM MULHERES COM CARCINOMA MAMÁRIO"

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

BANCA EXAMINADORA:	**CONCEITO**	**ASSINATURA**
Prof. Dr. Benedito Borges da Silva - UFPI (Presidente)	SATISFATÓRIO	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI (Examinadora)	SATISFATÓRIO	
Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira – UFPI (Examinadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. Pedro Vitor Lopes Costa - UFPI (Examinador)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 09 de maio de 2019.
HORÁRIO: 14:30h
LOCAL: Auditório do Curso de Farmácia

Scanned by CamScanner

DEDICATÓRIA

Dedico esta vitória primeiramente a **Deus** e **Nossa Senhora** por serem meu refúgio e proteção, porque quando quis fraquejar, me deram a paciência e a temperança para suportar os desafios que surgiram ao longo do caminho. Aos meus pais, **Osvaldo Telesforo Sampaio** e **Maria Célia Leão Araújo Sampaio**, ao meu esposo **Danilo Pinheiro** e à minha filha **Maria Elisa** por me ensinarem todos os dias o que realmente é importante nessa vida e por compreenderem as muitas horas de ausência e por me levantarem nos momentos difíceis. À família que tão bem me acolheu e me apoiou em todos os momentos especiais da minha vida, **Maria de Fátima Pinheiro, Marina Pinheiro e Ernani de Jesus Sousa (in memória)**. Dedico também aos meus irmãos da **Comunidade Católica Shalom** por toda intercessão e incentivo que me fazem sentir mais forte na construção do melhor caminho. Agradeço, enfim, todo apoio que me deram para iniciar e terminar essa jornada. Obrigada por sempre me incentivarem a conquistar os meus sonhos.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao **Profº**. **Drº. Benedito Borges da Silva,**

mestre na verdadeira acepção da palavra, pela grandeza humana, por não medir esforços em transmitir seus conhecimentos, por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer, eterno conselheiro e grande brilhantismo na orientação deste trabalho. Pelo exemplo de homem ético, professor e pesquisador que tem dedicado sua vida a formação de recursos humanos.

AGRADECIMENTOS

Às **pacientes** do Setor de Mastologia do Hospital Getúlio Vargas, sem os quais não seria possível a realização deste estudo.

Ao Magnífico Reitor, **Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes**, pelo grande incentivo à pesquisa em nossa Instituição.

À Vice-Reitora, **Profa. Dra. Nadir Nogueira do Nascimento** pelos ensinamentos e apoio à pesquisa na UFPI.

À **Profa. Dra. Carla Eiras**, coordenadora do RENORBIO Ponto Focal do Piauí, pelo apoio e incentivo àpesquisa stricto sensu no Piauí e por ser resposta de Deus quando necessitei.

À **Dra. Maria de Fátima Garcez de Oliveira**, Diretora do Hospital Getúlio Vargas, instituição que sedia a Clínica Ginecológica e alguns docentes da Disciplina de Ginecologia da Universidade Federal do Piauí, pelo apoio na realização deste estudo.

Aos Mastologistas: Dr**. Ricardo Keyson, Dra Jaqueline, Dra. Patricia e Dr. Pedro Vitor Lopes Costa** pela ajuda na coleta dos dados e seleção dos pacientes, imprescindíveis à realização deste trabalho.

Aos funcionários da Clínica de Mastologia e Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas: **D.Efigênia, D. Eugênia, Ulcimar, Toinha, D. Socorro Ramos**, pelo carinho e ajuda a mim concedidos.

Aos colegas de Doutorado: **Luana Mota Martins, Carla Solange Escórcio Dourado, Camila Revoredo, Gilmara Péres, Danylo Raphael, Conceição Barros, Larisse Campos Verdes e Adelton Ribeiro.**

Aos colegas do grupo de pesquisa, **Victor Oliveira, João Paulo** e demais colegas do grupo.

À patologista **Dra Lina e a Diana**, funcionária do setor de patologia do Hospital São Marcos pela parceria na confecção dos blocos de parafina.

Às secretárias do Renorbio, **Deusilene e Eliana.** À **Edilene**, secretária do Mestrado Ciências e Saúde, pela ótima companhia nos momentos de espera e

a **Eugênia**, secretária do setor de Mastologia pelos ótimos momentos de descontração

À **Jennifer** e **Juliana Severo** por todas as contribuições na construção dessa tese

Aos companheiros de trabalho do Centro Universitário de Ciências e Tecnologia do Maranhão- UniFacema **Daniele Rodrigues, Amanda Marreiro, Hélio Martins, Rodrigo Aragão e Thanandra** por sempre me incetivarem com palavras de estímulos e pelos momentos de descontração em nossas viagens e na sala dos professores.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SAMPAIO, F.A. Expressão da proteína metalotioneína-1 em mulheres com carcinoma mamário. 100p. **Tese de Doutorado** (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia)- Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.

O câncer de mama é a neoplasia mais comum que acomete as mulheres nos países ocidentais, sendo a principal causa de morte entre as mulheres em todo o mundo. No Brasil, foram estimados 59.700 casos novos de câncer de mama para 2018-2019, com um risco de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Investigar biomarcadores no câncer de mama é importante para a identificação de marcadores mais precisos, tais como os relacionados à proliferação celular e apoptose, pois apresentam a vantagem de sofrer alterações em seus níveis antes de qualquer resposta clinica ao tratamento, e assim poderiam selecionar melhor as pacientes que se beneficiariam do tratamento adjuvante. A metalotioneína (MT), em particular a sua isoforma MT-1, tem sido associada a maior proliferação, redução da apoptose de células malignas e a um pior prognóstico. Estudos sugerem que a hiperexpressão da MT apresenta, entre outros mecanismos, efeito anti-apoptótico por comprometer a função da p53 no núcleo celular, proteína responsável por estabilizar a manutenção da integridade do genoma. A literatura sobre este tema ainda é escassa e controversa. Todavia, até onde investigamos nas principais bases de dados, não encontramos estudos que avaliassem a expressão imunoistoquímica da MT-1 em carcinoma mamário e fibroadenoma em mulheres na idade reprodutiva. Esta tese foi estruturada em dois capítulos: O capítulo I teve como objetivo avaliar a interação da atividade da metalotioneína, zinco e p53, assim como sua expressão gênica em linhagens de células com câncer de mama ou em estudos com animais. Esta revisão sistemática não revelou relação entre metalotioneína, zinco e p53, quando avaliados em conjunto, mas monstrou interações entre esses biomarcadores quando avaliados em pares. O capítulo II teve como objetivo comparar a expressão da metalotioneína-1 entre o câncer de mama (estudo, n=30) e o fibroadenoma (controle, n=36) de mulheres na idade reprodutiva, que mostrou uma porcentagem média de núcleos corados com anti-MT-1 de 26,93% e 9,10% nos grupos estudo e controle, respectivamente ($p<0,001$). Outrossim, os tumores histológicos de grau 3 mostraram uma expressão de MT-1 significantemente maior do que o grau histológico 1 ($p <0,05$), sendo que os tumores negativos para receptores de estrogênio, progesterona e HER2 negativos apresentaram uma expressão de MT-1 significantemente maior do que estes parâmetros positivos ($p<0,05$). O presente estudo mostrou que a expressão imunohistoquímica da proteína MT-1 foi significantemente maior no câncer de mama do que no fibroadenoma e também foi possível observar maior imunorreatividade da metalotioneína-1 em células de tumores considerados mais agressivos.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Fibroadenoma. Metalotioneína. p53. Zinco. Biomarcadores.

SAMPAIO, F.A. Expression of metallothionein-1 protein in women with mammary carcinoma. 100p. PhD Thesis (Post-Graduate Program in Biotechnology) - Federal University of Piauí, Teresina, 2019.

Breast cancer is the most common neoplasm that affects women in Western countries, being the leading cause of death among women worldwide. In Brazil, 59,700 new cases of breast cancer were estimated for 2018-2019, with a risk of 56.33 cases per 100,000 women. Investigating biomarkers in breast cancer is important for the identification of more accurate markers, such as those related to cell proliferation and apoptosis, as they have the advantage of undergoing changes in their levels before any clinical response to treatment, and thus could better select the patients who would benefit from adjuvant treatment. Incidentally, metallothionein (MT), in particular its MT-1 isoform, has been associated with increased proliferation, reduction of malignant cell apoptosis and a poorer prognosis. Studies suggest that the hyperexpression of MT has, among other mechanisms, an anti-apoptotic effect because it compromises p53 function in the cell nucleus, a protein responsible for stabilizing the maintenance of genome integrity. The literature on this subject is still sparse and controversial. However, as far as we investigated in the main databases, pubmed and web of science, we did not find studies that evaluated the immunohistochemical expression of MT-1 in mammary carcinoma and fibroadenoma in women of reproductive age. This thesis was structured in two chapters: Chapter I aimed to evaluate the interaction of metallothionein, zinc and p53 activity, as well as its gene expression in breast cancer cell lines or in animal studies. This systematic review revealed no relationship between metallothionein, zinc and p53 when assessed together, but showed interactions between these biomarkers when evaluated in pairs. However, new studies, especially in vivo, are needed to elucidate the molecular mechanisms of metallothionein's action in preventing breast cancer or its role in disease progression. The objective of this study was to compare the expression of metallothionein-1 between breast cancer (study, n = 30) and fibroadenoma (control, n = 36) in women of reproductive age, which showed a mean percentage of nuclei stained with anti-MT-1 of 26.93% and 9.10% in the study and control groups, respectively ($p < 0.001$). In addition, grade 3 histological tumors showed a significantly higher MT-1 expression than histological grade 1 ($p < 0.05$), and negative tumors for estrogen, progesterone and HER2 negative receptors showed an expression of MT -1 significantly higher than these positive parameters ($p < 0.05$). The present study showed that the immunohistochemical expression of MT-1 protein was significantly higher in breast cancer than in fibroadenoma, and it was also possible to observe greater immunoractivity of metallothionein-1 in tumor cells considered more aggressive.

Keywords: Breast Cancer. Fibroadenoma. Metallothionein. p53. Zinc. Biomarkers.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOSE SIGLAS

AP-1 Ativação da proteína1

Bcl-2 Linfoma de células B2

BRCA1 Breast Cancer1

BRCA2 Breast Cancer2

CDH1 Cadherin1

CDI Carcinoma ductal invasivo

CDIS Carcinomaductalinsitus

CL Câncer Lobular

C-myc Fator de transcrição do gene regulador da codificação

COX-2 Ciclooxigenase 2

DOX Doxorrubina

DRB Daunorrubicina

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DM Densidade Mamária

ECM Matriz Extracelular

EROS Espécies Reativas de Oxigênio

FGF Fator de Crescimento de Fibroblasto

IGF Fator de Crescimento à insulina

IMC Índice de Massa Corpórea

INCA Instituto Nacional do Câncer

iONS Óxido nítrico Sintetase Indutível

IL-10 Interleucina10

IL-6 Interleucina 6

MMP-9 Metaloproteinases de Matriz 9

MT Metalotioneína

NFKβ Fator Nuclear Kappa B

PALB2 Partmer and Localizer of BRCA 2

PTEN Fosfatase e Homólogo de Tensinas

PUFA Ácidos Graxos Poliinsaturados

TGF-β Fator de Crescimento Transformador β

TNF-α Fator de Necrose Tumoral α

TRH Fator de Reposição Hormonal

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Etapas da carcinogênese..... 32
Figura 2. Imagem imunohistoquimica em dedo de luva do fibroadenoma 34
Figura 3. Mecanismo da participação da metalotioneína na carcinogênese.....37
Figura 4. Representação da superexpressão da metalotioneína no câncer de mama e o sequestro do zinco do núcleo da célula, comprometendo a função apoptótica da p53.....38

CAPITULO 1

Figura 1 Diagrama de fluxo da seleção do estudo. 54

CAPITULO 2

Figura 1. Fotomicrografias de corte histológicos de fibroadenoma de mama (A), carcinoma de mama grau 1 (B), carcinoma de mama grau 2 (C) and carcinoma de mama grau 3 (D). Houve maior concentração de núcleos corados por anti-MT-1 nas células do carcinoma da mama em comparação com as células do fibroadenoma (aumento original de X400)…….. ……83

Figura 2. Expressão de MT-1 em diferentes graus histológicos do carcinoma ductal invasivo da mama. 84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características dos estudos experimentais em linhagens celulares humanas incluídas nesta revisão.....57
Tabela 2. Características dos estudos experimentais em linhagens celulares de camundongos incluídos nesta revisão.....59

CAPÍTULO 2

Tabela 1**.**Características dos pacientes na amostra do estudo…….....74
Tabela 2. Percentagem média de núcleos de metalotioneína por 500 células nos grupos controle e estudo…….....75
Tabela 3. Expressão média da metalotioneína-1 em tumores positivos / negativos para ER, PR e Her2…….....75

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA VI

DEDICATÓRIA ESPECIAL VIIIII

AGRADECIMENTOS X

RESUMO XIIIII

ABSTRACT XV

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS XVIIII

LISTA DE FIGURAS XIX

LISTA DE TABELAS XXI

1. INTRODUÇÃO 25

2. REVISÃO DE LITERATURA 28

2.1. Câncer de Mama 29

2.1.1. Epidemiologia 29

2.1.2. Etiologia e Fatores de Risco 29

2.1.3. Carcinogênese 32

2.2. Tumores Mamários e Biomarcadores 34

2.3. Metalotioneína no Câncer de Mama 37

REFERÊNCIAS 43

3. CAPITULOS 50

3.1 Capítulo 1 51

Influência da Metalotioneína no Conteúdo de Zinco e na atividade da p53 no câncer de mama: Uma revisão sistemática 52

3.2 Capitulo 2.. 70

Estudo Caso-Controle da expressão da Metalotioneína-1 em cancer de mama e fibroadenoma 71

4.CONSIDERAÇÕES FINAIS 87

ANEXO 89

APÊNDICE 98

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença causada pela multiplicação anormal das células mamárias, caracterizada pelo desequilíbrio entre os fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, os quais favorecem a ocorrência de mutações ou ativação anormal de genes que controlam o crescimento e mitose celular (SILVA et al., 2012).

Por sua vez, o fibroadenoma é o tumor benigno mais comum em mulheres na idade reprodutiva (CIUREA et al., 2018), todavia alguns autores não consideram o fibroadenoma um verdadeiro tumor, preferindo rotulá-lo como *aberrations of normal development and involution* (ANDI) do lóbulo mamário (KAUR et al., 2012). È considerado pelos autores como sendo o tumor benigno mais freqüente na idade reprodutiva, com raro risco de associar-se ao carcinoma de mama (NASSAR et al., 2016). Segundo Willian et al. (2018), o conhecimento mais detalhado desse tipo de lesão evitará procedimentos invasivos em excesso ou falha no diagnóstico eventual de lesões malignas.

É importante ressaltar que apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento, as taxas de morbidade e mortalidade relacionadas ao câncer de mama vêm aumentando progressivamente (BRAY et al., 2018), tendo sido estimado mais de 627.000 óbitos para o ano de 2018 (INCA, 2018). Dessa forma, o diagnóstico precoce é de fundamental importância para redução da morbiletalidade pelo câncer de mama (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014).

Sobre este aspecto, é oportuno mencionar que apesar da mamografia ser considerada exame padrão no diagnóstico do câncer de mama, outros instrumentos são necessários para investigar alterações tumorais mais precoces que as manifestações clínicas, a exemplo dos biomarcadores (MAKLUF et al., 2006). A propósito, a utilização da expressão da Metalotioneína (MT) na prática clínica pode contribuir para melhorar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, pois a doença é comumente diagnosticada em estágios avançados (OSTRAKHOVITCH et al., 2007).

A hiperexpressão da metalotioneína tem sido associada a diversos processos intracelulares, incluindo seu papel na proliferação, diferenciação, quimioresistência e principalmente sua ação anti-apoptótica (GOMULKIEWICZ

et al., 2010), pois sua presença, em particular a isoforma metalotioneína-1 (MT-1) participa da compartimentalização do mineral zinco (BELLAZO et al., 2018;BIZÓN et al., 2017). Na deficiência desse mineral, a metalotioneína sequestra zinco de moléculas da p53 no núcleo celular para o citoplasma, induzindo desequlíbrio no domínio de ligação e conformação do DNA, com comprometimento da função apoptótica da p53 (OSTRAKHOVITCH et al., 2006).

Considerando a alta incidência do fibroadenoma em mulheres na idade reprodutiva, assim como o aumento crescente do câncer de mama e o papel relevante da expressão imunohistoquímica da metalotioneína-1 na progressão e prognóstico dessa neoplasia, bem como a escassez de dados na literatura comparando a expressão da MT-1 no câncer de mama e no fibroadenoma em estudos *in vivo,* nos motivou ao desenho do presente estudo, estruturado sob a forma de dois capítulos. O capítulo I trata de um artigo de revisão sistemática que investigou a interação da atividade de metalotioneína, zinco e p53 no câncer de mama e que resultou em um manuscrito, sob revisão, submetido ao jornal médico “Biometals” (Fator de imapacto JCR 2.478, Qualis B1 em Biotecnologia). O capítulo II trata do estudo que avaliou a expressão da metalotioneína-1 em câncer de mama (estudo) e fibroadenoma (controle), o que gerou um manuscrito publicado pelo períodico “Scientific Reports” (Fator de impacto JCR 4.122, Qualis A1 em Biotecnologia).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CÂNCER DE MAMA

2.1.1. Epidemiologia

O câncer se tornou um grave problema de saúde pública, visto que a incidência, o número de mortes e o impacto econômico advindos desta doença vêm aumentando nas últimas décadas. Dentre os diversos tipos de câncer, destaca-se o câncer de mama, neoplasia mais comum entre as mulheres nos países ocidentais e principal causa de morte em todo o mundo, tendo sido estimado para o ano de 2018-2019 mais de 2.089 milhões de casos novos e uma taxa de mortalidade de 6,6%, com mais de 627.000 óbitos ao ano (BRAY et al., 2018; INCA, 2016).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum e representou mundialmente 25% de todos os novos casos de câncer diagnosticados em 2012. A incidência é mais elevada nas regiões bem desenvolvidas do mundo em comparação com as regiões em desenvolvimento e subdesenvolvidas, com uma variação de 27 casos por 100.000 mulheres na África Oriental para 96 casos por 100.000 mulheres na Europa Ocidental (FERLAY et al., 2015).

No Brasil, o câncer ganha relevância pública devido ao perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando. Em 2015, no Brasil, ocorreram 15.403 óbitos por câncer de mama e para o ano de 2018 e 2019 foi estimado 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, enquanto que para o estado do Piauí foram estimados cêrca de 600 casos novos para este mesmo ano (BRAY et al., 2018; INCA, 2016).

2.1.2. Etiologia e Fatores de Risco

O câncer de mama é uma doença multifatorial que envolve desequilíbrio entre fatores genéticos, dietéticos, hormonais e reprodutivos, determinada pela ocorrência de mutações ou de alguma ativação anormal de genes que controlam o crescimento e a mitose celular (SILVA et al., 2012). Atualmente, são conhecidos diversos *loci* que podem contribuir para sua origem familiar,

sendo os mais importantes os genes BRCA1 e BRCA2 (breast cancer gene 1 e 2), considerados importantes supressores tumorais, envolvidos, principalmente, no reparo de DNA (ANDERSON et al., 2014).

Outros genes supressores tumorais com importante ação nos processos de regulação do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA também se encontram frequentemente alterados, sendo eles: TP53 (tumor protein p53), PTEN (phosphatase and tensin homolog), PALB2 (partner and localizer of BRCA2); CDH1 (cadherin1) (SCHON; TISCHKOWITZ, 2017).

Apesar do câncer ser considerado uma doença de caráter genético e/ou hereditário, esses fatores representam uma pequena proporção de risco de câncer de mama quando comparados a mudanças de estilo de vida como aumento do consumo de álcool, dieta com alta ingestão de carboidratos refinados e gorduras saturadas, bem como ingestão reduzida de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), fibras e vitaminas (como folato, vitamina D e carotenóides) e comportamento sedentário (ROMIEU; AMADOU; CHAJES, 2017).

Nesse cenário, é importante mencionar que a obesidade, doença crônica e de prevalência elevada, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, também está associado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, em particular, o de mama. A disfunção do tecido adiposo observado nessa doença promove alterações metabólicas relevantes na gênese do câncer de mama, principalmente em mulheres na pós menopausa. O excesso de peso promove o aumento do nível de estrógeno circulante, pois o tecido adiposo constitui o principal local de síntese desse hormônio em mulheres na pós-menopausa (CABIA et al., 2016).

A exposição excessiva ao estrógeno está associada ao aumento do risco de câncer de mama devido ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que exercem genotoxicidade, por favorecer indiretamente a instabilidade genômica e estimular a progressão da carcinogenicidade mamária, induzindo maior estresse oxidativo (WEN et al., 2017).

Além de sua participação na produção de estrogênios, a obesidade também promove um incremento da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (AGRESTI et al., 2016). Estas substâncias

associadas a outros fatores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina e proteína C reativa, produzidos pelos adipócitos, induzem à progressão do ciclo celular e à inibição da apoptose, o que aumenta o risco de desenvolvimento do câncer. Além disso, acredita-se que os fatores inflamatórios mencionados promovam a superexpressão de oncogenes (INUMARU; SILVEIRA; NAVES, 2011).

Estudos têm demonstrado que valores elevados do índice de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura estão associados a maior risco de câncer de mama, em particular o tipo triplo negativo, o qual possui um caráter mais agressivo e pior prognóstico clínico em mulheres na fase reprodutiva (WHITE et al., 2015; AGRESTI et al., 2016). Silva et al. (2018) mostraram que o ganho de peso <10 kg em 6 anos aumenta em 14% o risco para de mama, enquanto que o aumento de 10 kg ou mais elevou em 16% este risco, independente dos valores de IMC.

Outros fatores estão envolvidos no risco para o câncer de mama, tais como idade da primeira menstruação quando menor do que 12 anos, menopausa tardia, mulheres nulíparas ou baixa paridade, primeira gestação tardia, uso contínuo de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (TRH) na pós menopausa, especialmente se por mais de cinco anos e exposição à radiação ionizante (INCA, 2016; STEWART; WILD, 2014).

A idade é um dos principais fatores que aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer de mama, devido ao acúmulo de exposições aos riscos ao longo da vida e as próprias alterações biológicas decorrentes do envelhecimento, sobretudo, a partir dos 50 anos. O envelhecimento é considerado um forte fator de risco, uma vez que mulheres com mais de 40 anos apresentam 10 vezes mais chance de desenvolveram câncer de mama que mulheres jovens (OLDENBURG et al., 2007). Além disso, mulheres negras são diagnosticadas em idades mais precoces, porém mulheres brancas têm de 20-40% mais chances de desenvolverem a doença, 59 e 63 anos, respectivamente (DESANTIS et al., 2017).

A densidade mamária é medida pela proporção de tecido fibroglandular no tecido mamário. Valores superiores a 70% podem mascarar lesões, a multifocalidade tumoral, cancer bilateral não suspeito e ainda subestimar o

tamanho tumoral (ALBERT et al., 2015; BANSAL et al., 2016). Além disso, densidade mamária superior a 75% aumentam o risco de câncer de mama em 4-6 vezes, por isso tem sido considerada um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (RICE et al., 2016; ZIEMBICKI et al., 2017). A densidade mamária pode ser influenciada pela idade, menopausa, antropometria, fatores hormonais, genéticos e reprodutivos, entre outros (AMADOU et al., 2016; FJELDHEIM et al., 2016). Todos esses fatores estão relacionados à carcinogênese mamária.

2.1.3. Carcinogênese

A patogênese neoplásica é um processo complexo que pode ser dividido em quatro etapas distintas. São eles: iniciação, promoção, progressão e metástase (**Figura 1**) e em todas as fases da carcinogenêse ocorrem mudanças na estrutura do genoma (KADAM; ABHANG, 2016). A iniciação é caracterizada pela interação dos agentes carcinogênicos com DNA que resultam em mutagênese (MINAMOTO; MAI; RONAI, 1999).

A célula iniciada não é uma célula neoplásica, mas tomou seu primeiro passo em direção a este estado com sucessivas mutações genotípicas e mudanças fenotípicas. Danos no DNA têm sido bem estabelecidos como o evento que inicia a carcinogênese química, porém podem ser reparados por enzimas ou eventos como a apoptose, porém a expansão clonal das células iniciadas resultam de um processo mitogênico causado pelo aumento do número de novas células e inibição da apoptose (SANTELLA et al., 2005; TROSKO, 2001).

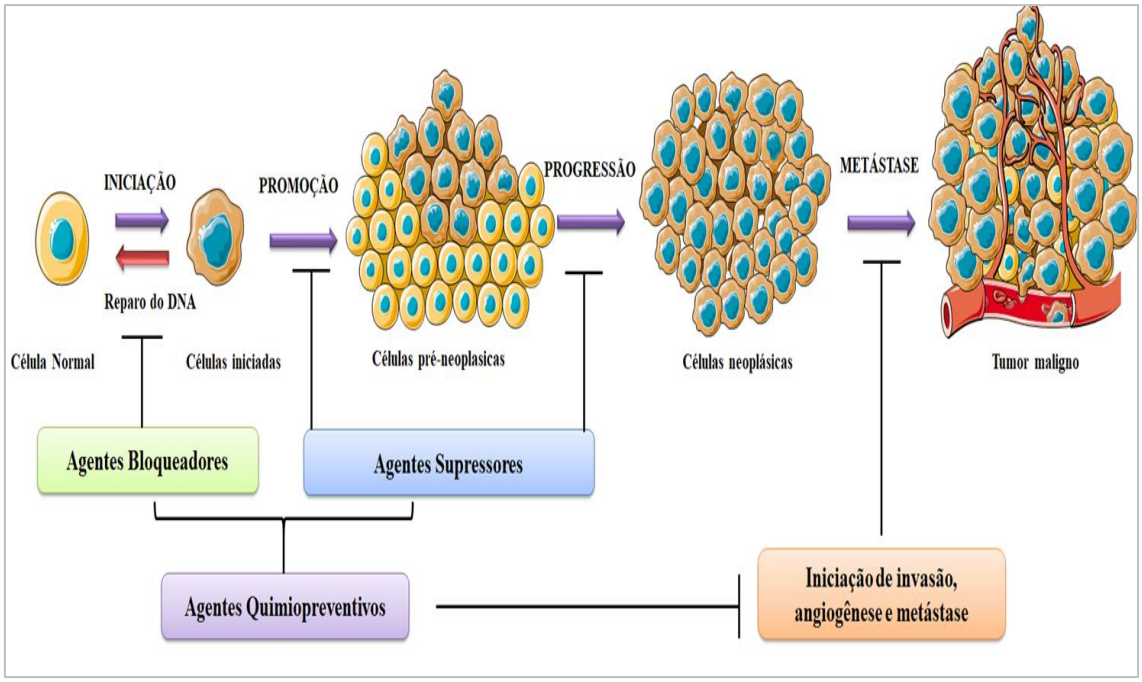
Nesta fase, as células iniciadas podem permanecer latentes por semanas, meses ou anos, ou podem crescer de forma autônoma e clonal. O processo de iniciação garante que a divisão celular permaneça simétrica, criando duas novas células iniciadas e se a divisão celular ocorrer antes que os sistemas de reparo de DNA possam agir, torna-se permanente e irreversível. (TROSKO, 2003). Assim, um agente quimiopreventivo eficaz deve intervir principalmente no início do processo de carcinogênese para eliminar doenças pré-malignas antes de se tornarem malignas.

No estágio de promoção tem como principal característica a proliferação das células do início tumoral e, em particular, proliferação celular *versus* apoptose, portanto, ainda é um estágio reversível por se tratar de células pré-cancerosas (DAYEN et al., 2016; NIU; CHEN, 2010). Nessa etapa, são necessários agentes promotores da mitogênese, os quais devem estar presentes por semanas, meses e anos para ser eficaz e sua eficácia depende da sua concentração no tecido alvo e após o desaparecimento de um promotor, a regressão na proliferação celular pode ocorrer, provavelmente por apoptose (OLIVEIRA et al., 2007).

Por outro lado, o estágio de progressão tumoral é irreversível, caracterizado, principalmente, pela transformação gradual das células para o estado maligno com o surgimento de invasão e metástase via processo angiogênico (RABAJI; MOUSA, 2017). Durante essa etapa, a proliferação celular é independente da presença de agentes estimuladores (GUTIÉRREZ; SALSAMENDI, 2001).

A progressão é caracterizada pela irreversibilidade, instabilidade, crescimento mais rápido, invasão, metastização e alterações nos processos bioquímicos, metabólicos e morfológicos das células (KOPRAS, 2004). A angiogênese, como uma ocorrência epigenética, é essencial para a progressão neoplásica e a aquisição de um fenótipo angiogênico precede o desenvolvimento de características que contribuem para a malignidade e sua inibição atrasa o desenvolvimento neoplásico (OLIVEIRA et al., 2007).

Figura 1. Etapas da Carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Inamura et al., 2015.

Nesse contexto, a biologia molecular tem sido utilizada como ferramenta importante para esclarecer os mecanismos que regulam a proliferação e diferenciação celular, bem como para identificar marcadores tumorais e suas vias de ação. A identificação de marcadores que possam predizer o comportamento biológico dos tumores é especialmente importante no câncer de mama devido a possibilidade de avaliar a agressividade e progressão da doença (DOWSETT et al., 1999; MAKLUF et al., 2006). A propósito, o envolvimento de biomarcadores como a metalotioneina têm sido associado ao processo de carcinogênese mamária (OSTRAKHOVITCH et al., 2016).

Os biomarcadores utilizados para estabelecer um perfil molecular completo dos vários tipos de câncer de mama, além de controversos são escassos, sendo necessária uma maior investigação com biomarcadores para caracterização molecular completa do tecido mamário humano tanto em amostras tumorais com câncer quanto em tecidos normais ou tumorais benignos, como o fibroadenoma (MARGAN et al., 2016).

2.2 TUMORES MAMÁRIOS E BIOMARCADORES

Apesar das doenças benignas da mama muitas vezes serem consideradas como lesões pré-malignas, apenas uma parcela delas progride para câncer, lesões proliferativas sem atipias aumentam o risco para o desenvolvimento de carcinoma ductal invasivo (CDI) em cerca de 2%, enquanto que lesões hiperplásicas com atipias aumentam em 3,5-5% (BANE, 2013; COLE et al., 2010).

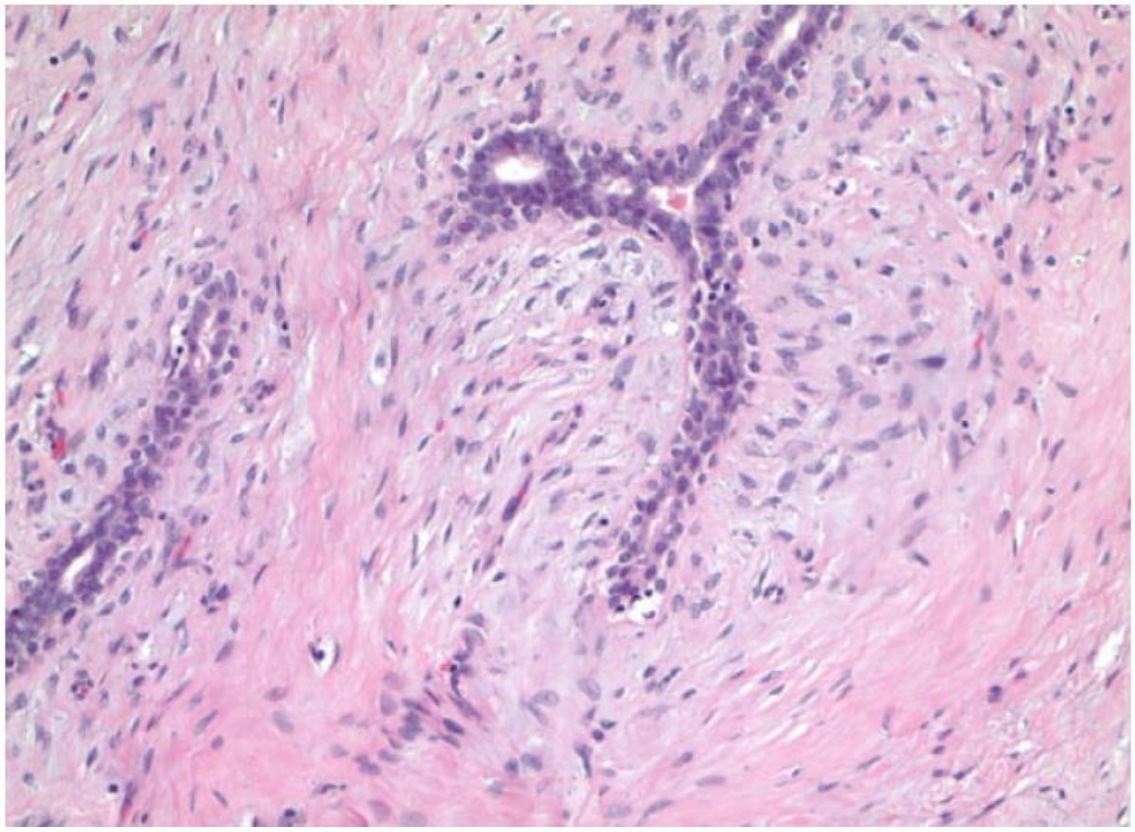
As alterações mamárias vão desde problemas congênitos à aqueles adquiridos posteriormente e ambos possuem uma ampla diversidade histopatológica. As anomalias não congênitas mais comuns na mama, incluindo formações tumorais são: fibroadenomas, tumores filóides, cistos, lesões esclerosantes, secreção mamilar, mastalgia, infecções mamárias, necrose da área gordurosa, hiperplasia lobular e ductal (típica e atípica) e os carcinomas lobular (CL) e ductal *in situ* (CDIS) (COLE et al., 2010; GALEA, 2016).

Os fibroadenomas são as lesões benignas mais freqüentemente encontradas em mulheres jovens, com uma prevalência de 15-23% e devido a pouca idade das pacientes, entre 20 e 30 anos, geralmente são diagnosticados por ultra-som (CIUREA et al., 2018). Todavia alguns autores não consideram o fibroadenoma um verdadeiro tumor, preferindo rotulá-lo como aberrations of normal development and involution (ANDI) do lóbulo mamário (KAUR et al., 2012).

Segundo Carter et al. (1995), os fibroadenomas são tumores sólidos com proliferação intraparenquimal benigna dos ductos intra-lobulares e ácinos, compostos por células estromal e epitelial, apresentam crescimento lento, com tamanho comumente menor que 3 cm, com exceção de fibroadenomas gigantes raros. Gordon et al. (2003) relataram uma taxa de crescimento seguro de 20% nas três dimensões ao longo de um período de 6 meses para todas as faixas etárias.

O fibroadenoma aparece bem circunscrito, com consistência firme e superfície homogênea, microscopicamente, apresentam crescimento bifásico com proliferação ductal e estromal (YANG et al., 2014). Observam-se nos esfregaços grupos celulares epiteliais em dedo de luva, formando agrupamentos arborescentes e numerosos núcleos desnudos (**Figura 2**) (ROSEN, 2001).

FIGURA 2. Imagem imunohistoquimica em dedo de luva do fibroadenoma



Fonte: Willams, 2018.

Na patologia, os fibroadenomas são classificados como tumores fibroepiteliais. No exame macroscópico eles são redondos, lesões ovais bem definidas, encapsuladas e geralmente lobuladas, claramente delineado dos tecidos circundantes (LEE et al., 2018). Sendo uma proliferação das células normais da mama, fibroadenomas podem sofrer as mesmas alterações, como parênquima mamário, incluindo o desenvolvimento de malignidade.

Segundo Nassar et al.(2016), o risco geral de desenvolver cancer de mama em pacientes com história de fibroadenoma é baixo, podendo ser maior em mulheres com história familiar de câncer de mama. No entanto, em raras ocasiões, o câncer invasivo pode se desenvolver em fibroadenoma, assim como pode em qualquer outra parte da mama (AMIN et al., 2013; JAYASINGHE et al., 2009).

Assim como no cãncer mamário, biomarcadores como a metalotioneína também têm sido avaliada em tecidos mamários normais com tumores benignos, como fibroadenoma, pois essa proteína pode ser expressa por

células normais e cancerosas, estando envolvida na progressão do tumor de vários tecidos (DAVIES et al., 1993).

No estudo El Sharkawy e Farrag (2008) foi avaliado a superexpressão de metalotioneína em células do tecido do câncer de mama em comparação com as do fibroadenoma. Segundo os autores, uma maior expressão de MT estava relacionada ao comportamento agressivo do tumor no carcinoma ductal de mama em comparação com o fibroadenoma. Outros autores forneceram confirmação adicional de que a expressão nuclear maior de MT foi mais freqüentemente observada em carcinomas, em comparação com tumores benignos (GOMULKIEWICZ et al., 2010).

2.3 METALOTIONEÍNA NO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tumor maligno mais comum entre as mulheres no mundo todo, entretanto, apesar do progresso considerável no diagnóstico e terapia, ainda constitui um enorme problema de saúde pública. Nos últimos anos, muitos estudos têm procurado novos modelos preditivos e marcadores prognósticos (DAI et al., 2016; INCA, 2018).

Entre os novos biomarcadores investigados para o diagnóstico e progresso dessa neoplasia é possível destacar as metalotioneínas, proteínas intracelulares de baixo peso molecular (6-7 kDa), caracterizadas por altos níveis de resíduos de cisteína e baixo teor de aminoácidos aromáticos (DZIEGIEL et al., 2016). A MT desempenha papel importante nos processos fisiológicos, tais como: homeostase de elementos essenciais (zinco-Zn, cobre-Cu), desintoxicação de metais pesados (cádmio-Cd, mercúrio-Hg) e remoção de radicais livres como a hidroxila ($OH^{\bullet}$) e o ânion superóxido ($O2^{\bullet -}$) (CHERIAN et al., 2003).

Foram isoladas quatro isoformas básicas, MT-1, MT-2, MT-3 e MT-4, sendo as isoformas MT-1 e MT-2 presentes em quase todos os tecidos e relacionados à proliferação do câncer de mama e ao metabolismo do zinco, enquanto a MT-3 está presente no tecido cerebral e nas células epiteliais da próstata e do rim e a isoforma MT-4 é limitada ao epitélio da pele e seções do trato gastrointestinal superior (BIZÓN et al., 2017). A expressão da

metalotioneína usando anticorpos contra o epitopo E9, sua imunopositividade foi observada em células mioepiteliais e raramente, nas células epiteliais, corando núcleo e citoplasma das células (GUMULEC et al., 2014).

A propósito, ocorrem mudanças na localização das isoformas MT-1 e MT-2 à medida que o ciclo celular progride. Nas fases G0 e G1 estão inicialmente localizados no citoplasma e nas fases S e G2 são expressas no núcleo, ou seja, o ciclo da célula cancerosa apresenta forte relação com a expressão da metalotioneína e os mecanismos da carcinogênese (BARNES et al., 2000; JIN et al., 2001). No estudo de Nagel e Valle (1995) foi demonstrado que a expressão da metalotioneína aumentou de 2 a 3 vezes mais nos compartimentos celulares em proliferação quando comparadas a células com crescimento inibido e o pico da expressão ocorreram durante as fases de transição tardias G1 e G1 / S.

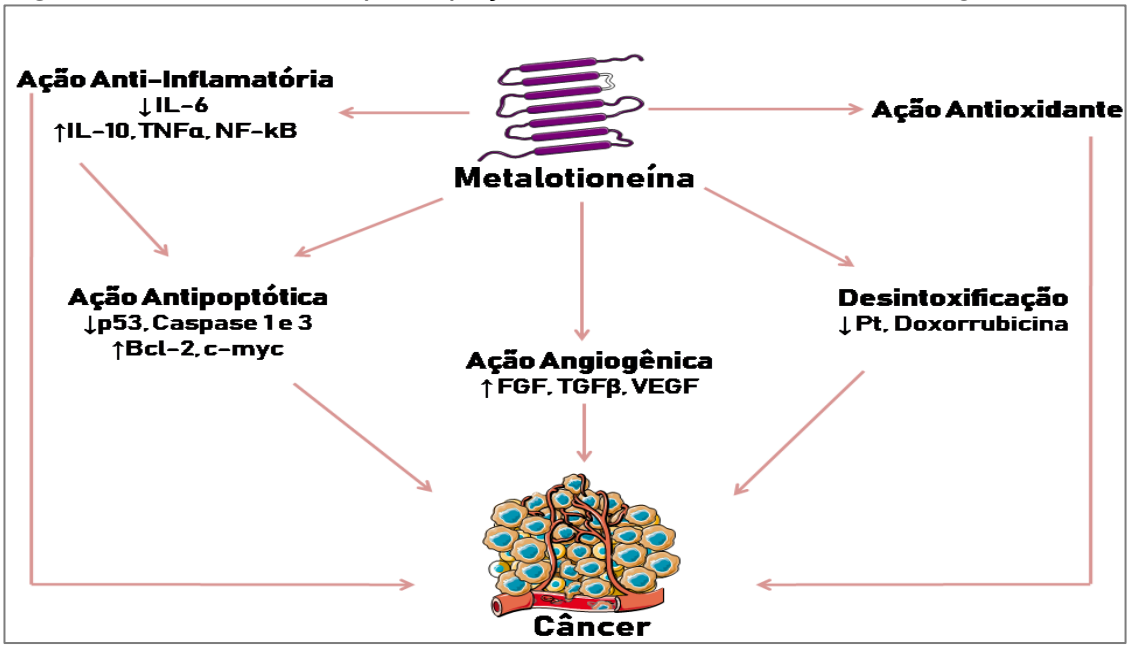
O papel potencial da MT na carcinogênese tem sido bem avaliada por Bizón et al., (2017), Cherian et al., (2003) e Jin et al.(2004) que relatam alguns mecanismos envolvidos nesse processo. A superexpressão da metalotioneína em células de carcinoma apresenta efeito anti-apoptótico provindo da ativação do fator nuclear Kappa B (NFKB) e estão relacionados a uma interação específica com a subunidade p50, sendo que MT pode ser requerida para estabilizar a ligação do NFKB ao DNA e desse modo realizar seus efeitos antiapoptóticos (ABDEL-MAGEED; AGRAWAL,1998). No estudo de Jin et al., (2004) foi relatado que as isoformas MT-1 e MT-2 interagem com a NFKB através do TNF-α também relacionado à proliferação celular e redução de apoptose.

Outro mecanismo pelo qual a metalotioneína inibe a apoptose é por meio da indução de genes anti-apoptóticos, especialmente Bcl-2 (Linfoma de células B2) e o gene regulador da codificação fator de transcrição c-myc, com inibição simultânea atividade protéica pro-apoptótica, especialmente caspase 1 e 3, exibindo uma ação supressora contra tumor (CHIMIENTI et al., 2001; CHUNG et al., 2008). Além disso, a expressão aumentada da metalotioneína em tecidos danificados pode resultar no aumento nas concentrações de citocinas, fatores de crescimento e genes mais resistentes ao estresse oxidativo, pois é capaz de inibir a atividade a óxido nítrico sintetase indutível,

(iNOS) e da ciclooxigenase 2 (COX-2), enzimas que catalisam as reações com espécies reativas de oxigênio (GALLICCHIO et al., 2005).

A **Figura 3** demonstra o resumo dos principais mecanismos que a metalotioneína se relaciona com a carcinogênese.

Figura 3: Mecanismo da participação da Metalotioneína na carcinogênese



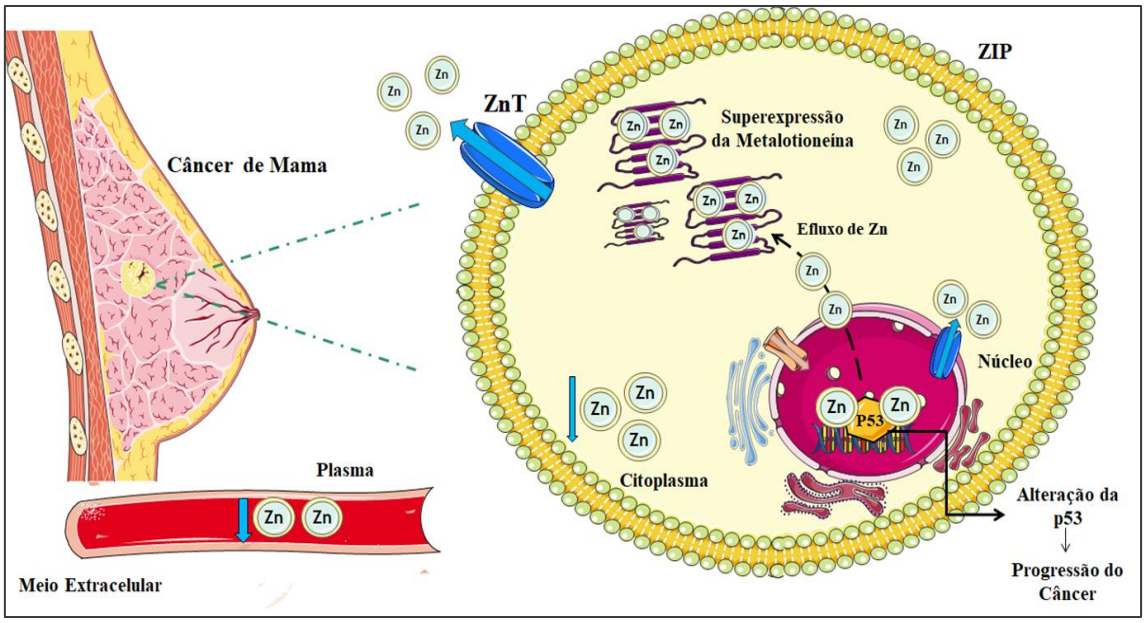
Fonte: Adaptado de Bizón et al., 2011.

A metalotioneína também é uma proteína com relevante papel na homeostase do zinco, esta transporta o mineral para o meio intracelular, onde o zinco será fonte para diversas proteínas e enzimas, como o receptor de estrogênio, fator de transcrição III A e dos domínios de estabilização da p53 (MÉPLAN;RICHARD; HAINAUT, 2000; OSTRAKHOVITC et al., 2006). Sob condições de deficiência do zinco citoplasmático, como é o caso do câncer de mama, a metalotioneína pode sequestrar zinco do núcleo celular e assim, reduzir a atividade de transcrição da p53, uma vez que as proteínas dedo de zinco participam da estabilidade funcional da proteína p53 (**Figura 4**) (TINOCO-VERAS, 2011).

Nesse sentido, a expressão aumentada da metalotioneína no tumor de células podem promover o aumento da proliferação, grau do tumor e sobrevivência de células através da desestabilização e inativação da p53, proteína responsável pela inibição da mitose celular e reparo no DNA alterado,

se esta não for eficiente o processo de apoptose é suprimido (ALAM; KELLEHER, 2012).

Figura 4: Representação da Superexpressão da Metalotioneína no câncer de mama e o sequestro do zinco do núcleo da célula, comprometendo a função apoptótica da p53.



Fonte: Adaptada Bae et al., 2018.

O supressor tumoral p53, codificado pelo gene TP53, é o gene mais comumente silenciado ou mutado no câncer. Em condições normais, os níveis de p53 são baixos e, em alguns casos, indetectáveis. No entanto, sinais de estresse como danos no DNA, a p53 ativada causa uma variedade de respostas, incluindo a apoptose, fornecendo uma barreira crítica contra o desenvolvimento do tumor (BAE et al., 2018).

Vale destacar que mutações somáticas no TP53 são comuns em câncer de mama compreende 80% dos casos e estão associados ao pior prognóstico e baixa resposta à quimioterapia (BRETON et al., 2005). Embora a maioria das mutações no p53 resulte em inativação ou disfunção de p53, algumas mutações no p53 levam à perda seletiva de funções apoptóticas, mantendo a capacidade de induzir o ciclo celular do tumor (WANG et al., 2015)

Segundo Bellazo et al. (2018), a utilização da mutação TP53 como fator prognóstico é inconsistente porque apesar do significado da mutação ser identificada na fase de pesquisa básica, a interpretação de seus resultados são complexas para aplicações clínicas. Por outro lado, a análise da expressão de

p53 como produto protéico é facilmente detectado por coloração imunohistoquímica (WANG et al., 2015).

No estudo de Coates et al. (2012) avaliaram 1113 pacientes com linfonodos negativos com câncer de mama e verificaram que a expressão de p53 foi associada ao pior prognóstico em tumores ER (+), enquanto os tumores ER (-) foram associados a um bom prognóstico. Embora a detecção imuno-histoquímica da proteína p53 não reflita com precisão a mutação TP53, alguns estudos revelam correlação entre eles (BROSH; ROTTER, 2009; PETITJEAN, 2007).

Enquanto a metalotioneína também participa de outros mecanismos envolvidos na angiogênese, como o fator de crescimento de fibroblastos (fibroblastos fator de crescimento, FGF), fator de crescimento transformador (fator de crescimento transformador, TGF-β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), resultando em melhor suprimento sanguíneo para o tumor e seu aumento (CHERIAN et al., 2003). Na pesquisa de Jin et al. (2002) foi relatado que a MT se correlaciona positivamente com a proliferação celular e o grau histológico, sendo o grau 3 de maior expressão da metalotioneína quando comprado aos graus 1 e 2, o que confirma a participação da MT no crescimento e invasão de células cancerosas.

No estudo de Kim et al. (2011) foi observado que a superexpressão de MT-2A aumenta a expressão da MMP-9, metaloproteinase responsável por promover a migração e invasão do câncer de mama por degradar a gelatina e o colágeno IV, principal componente da membrana basal, o que favorece a ruptura da membrana e disseminação de células cancerosas. Segundo os autores o mecanismo potencial para o aumento da expressão de MMP-9 induzida por MT-2A foi a ativação das vias de sinalização NFkB e AP-1, necessárias para a regulação positiva de MMP-9, assim, a regulação dessa metaloproteinase é um dos mecanismos pelos quais a MT-2A promove a invasão celular (LIU et al., 2017; OSANI et al., 2017).

A superexpressão da metalotioneína também está relacionada à resistência à radiação e drogas antineoplásicas, como a cisplatina (pt). A expressão aumentada de MT inativa a platina, inibindo a apoptose de células cancerígenas. Se antraciclinas forem usadas, especialmente a doxorrubicina,

(DOX) e daunorrubicina (DRB), a capacidade de MT para neutralizar radicais livres é o principal fator do surgimento de resistência aos quimioterápicos (BIZÒN et al., 2011).

Segundo Cherian et al. (2003) o seqüestro de radicais livres, drogas ou seus metabólitos pela MT podem inibir a interação direta de agentes antineoplásicos, diminuindo assim a eficácia de seus efeitos quimioterapêuticos. O papel da MT no desenvolvimento de quimioresistencia no ambiente clinico ainda é controverso, porém é importante desenvolver métodos terapêuticos que minimizaria o papel antioxidante e anti-apoptótico da MT, mantendo seu impacto na proteção de células saudáveis, expostos a efeitos nocivos de rádio e quimioterapia.

A partir dessas investigações pode-se concluir que a metalotioneína pode ser biomarcador de diferenciação celular no câncer de mama e agressividade. Estudos indicam que a superexpressão da MT-1 impede a ligação da p53 ao DNA, assim, o p53 pode não ser capaz de agir como um fator de transcrição e modular a transcrição gênica e apoptose, o que favorece a poliferaçao de células mamárias. Portanto, a compreensão aprofundada dos mecanismos envolvendo essa proteína pode contribuir com o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para pacientes com câncer de mama.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A case-control study of Metallothionein-1 expression in breast cancer and breast fibroadenoma

Received: 28 September 2018
Accepted: 27 April 2019

Fabiane Araújo Sampaio[1], Luana Mota Martins[1], Carla Solange de Melo Escorcio Dourado[1], Camila Maria Simplício Revoredo[1], Danylo Rafhael Costa-Silva[1], Victor Alves de Oliveira[2], Francisco Adelton Alves-Ribeiro[1] & Benedito Borges da Silva[1]

The overexpression of Metallothionein-1 (MT-1) may play an important role in breast cancer; however, few studies have compared MT-1 expression between breast cancer and fibroadenoma. A cross-sectional controlled study was performed in 66 premenopausal women, aged 20–49 years, who had been histologically diagnosed with breast fibroadenoma or breast cancer. The patients were divided into two groups: group A, control (fibroadenoma, n = 36) and group B, study (breast cancer, n = 30). Immunohistochemistry was performed on tissue samples of fibroadenoma and breast cancer patients to evaluate the expression of metallothionein using an anti-MT-1 polyclonal antibody (rabbit polyclonal anti-metallothionein-Catalog Number biorbyt-orb11042) at a dilution of 1:100. The data were analyzed using NOVA ($p < 0.05$). Microscopic analysis showed a higher concentration of anti-MT-1-stained nuclei in breast cancer tissues than in fibroadenoma tissues. The mean proportion of cells with anti-MT-1-stained nuclei was 26.93% and 9.10%, respectively, in the study and control groups ($p < 0.001$). Histological grade 3 tumors showed a significantly higher MT-1 expression than hitological grade 1 ($p < 0.05$), while breast tumors negative for estrogen-, progesterone- and HER2- receptors had a significantly higher MT-1 expression than positive breast tumors positive for these parameters ($p < 0.05$). MT-1 protein in women of reproductive age was significantly higher in breast cancer than in fibroadenoma in this study. Furthermore, there was higher MT-1 immunoreactivity in more aggressive tumors.

Breast cancer is the most common malignancy that affects women in western countries and is the leading cause of cancer death among women worldwide[1,2]. In Brazil, 59,700 new breast cancer cases were estimated for the year 2018, with an estimated risk of 56.33 cases every 100 thousand women[3]. Although physical examination and mammography are important to ensure an early diagnosis of the disease and to reduce mortality, breast cancer is still frequently diagnosed at an advanced stage in Brazil. As a result, mortality rates are high even with current therapeutic strategies[4].

Nevertheless, it has been suggested that more adequate therapeutic and prognostic strategies in breast cancer can be developed using protein biomarkers, such as metallothionein. This protein has the advantage of not only interfering with cell apoptosis and proliferation but also undergoing alterations well before the occurrence of clinical tumor alterations[5] and thus may better guide treatment and prognostic strategies[6,7]. Metallothionein (MT) is a protein that has been widely studiedas a prognostic marker for breast cancer, since it promotes apoptosis, proliferation and differentiation of malignant tumor cells, making them more resistant to treatment[8–10]. Studies suggest that overexpression of metallothionein is associated with more aggressive breast tumors and more advanced-stage disease[11–14].

Some studies have shown that increased expression of MT is associated with a higher proliferative potential in various types of cancer and a more rapid disease progression, as well as cellular resistance to chemotherapy and

[1]Postgraduate Program, Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal University of Piauí, Teresina, Piaui, 64000-020, Brazil. [2]Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, 64000-020, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.A.S. (email: fabianesampaio21@gmail.com)

radiotherapy[15,16]. However, there is a paucity of studies evaluating the immunohistochemical expression of MT in breast cancer, and to the best of our knowledge, only one published study in the literature has compared the expression of MT-1 between women with breast cancer and women with fibroadenoma[14]. Furthermore, fibroadenoma is not classified as a tumor by some authors, but it is regarded as an aberration of normal development an involution (ANDI)[17]. Therefore, the conception of the current study was motivated by the paucity of studies that have compared MT-1 expression between fibroadenoma and breast cancer.

Patients and Methods

Study design. This study was approved by the Internal Review Board of the Federal University of Piauí (CAAE: 43447015.8.0000.5214). All patients signed a written informed consent form before study initiation. This is a cross-sectional case-control study involving patients seen at the Breast Clinic in Getúlio Vargas Hospital, Federal University of Piauí, Brazil from October 2014 to October 2016. Sample size was calculated and 71 patients were required for the study. However, due to technical problems there was a loss of 7% of the samples. As a result, the study included 66 premenopausal women distributed into 2 groups: A, control (fibroadenoma, n = 36) and B, study (cancer, n = 30). Premenopausal women with follicle-stimulating hormone (FSH) levels <30 mIU/ml, breast fibroadenoma or breast carcinoma, and no previous oncologic treatment were included in the study. Patients with fibroadenoma underwent histologic analysis of the tumors to confirm their benign status prior to immunohistochemistry.

Immunohistochemistry for MT-1. Breast tissue samples fixed in buffered formalin were cut into 3 μm-thick sections. Sections were deparaffinized in xylol for 5 minutes, dehydrated in absolute ethanol, washed in buffered saline solution at pH 7.4 for 5 minutes and then treated for 5 minutes with 3% hydrogen peroxide (H_2O_2) in buffered solution to block endogenous peroxidase activity. For antigen retrieval, the slides were placed in racks containing 0.21% citric acid (pH 6.0) and heated in a microwave oven for 15 minutes at maximum power. The slides were cooled, and phosphate-buffered saline was added for a cooling period of 20 minutes. Tissue samples were incubated overnight at 4–8 °C with monoclonal antibody metallothionein. A polyclonal antibody against MT-1 (rabbit polyclonalanti-metallothionein – Catalog Number biorbyt-orb11042) was used at a dilution of 1:100.

The slides were rinsed with PBS-Tween and incubated with secondary antibody (anti-mouse BA 2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 minutes at room temperature. After being washed again with PBS-Tween, the slides were incubated with reagents from the ABC Elite detection system (PK 6100, Vector Laboratories) for 45 minutes at room temperature. The samples were rinsed once more with PBS-Tween and incubated with DAB (1.0 ml EnVision FLEX DAB for one drop of chromogen) and for 5 minutes. Finally, the slides were washed with distilled water, counterstained with hematoxylin, stained with ammoniacal solution, dehydrated with absolute ethanol, passed through Coplin jars containing xylol and mounted in Permount resin. Cells expressing metallothionein protein were identified by dark brown staining in the nucleus and cytoplasm.

Quantitative method. Two observers, blinded to patient identity and previously unaware of any of the cases, performed quantification of protein expression using a light microscope (Eclipse E-400, optic microscope, Nikon, Tokyo, Japan) connected to a color video camera (CHC-370 N digital camera, Samsung, Seoul, South Korea), where image was captured and transmitted to a computer equipped with the Image Lab software program, version 2.3 (SOFTIUM Informatica Ltda, São Paulo, Brazil) for image analysis.

To determine metallothionein expression, we counted nuclei of stained cells under a microscope with a magnification of 400X. At least 500 cells of the breast epithelium were counted on each slide, in random fields, starting in the area of highest MT-1 concentration in the cell nucleus, using Processing Software and Image Analysis-Image Lab® (SOFTIUM Informatica Ltda, São Paulo, Brazil).

Statistical analysis. Statistical analyses for this study were conducted using the software R, version 3.2.2. Data were expressed as frequencies, percentages, measures of central tendency and dispersion. The normality of the data was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. The Levene test was used to verify data homogeneity. To compare more than two means between normal and homogenous data, we used Student's t-test and ANOVA. Significant levels were set at p values ≤ 0.05.

Results

Under optical microscopy, breast cancer cells had a higher concentration of nuclei stained with anti-MT-1 than fibroadenomas (Fig. 1). The characteristics of both groups were similar, except for age and waist circumference (Table 1).

Quantitative analysis showed mean percentages of nuclei stained with Metallothionein-1 per 500 breast epithelial cells in women at 9.10 ± 5.90 and 26.93 ± 15.87 in the control and study groups, respectively (Table 2).

Furthermore, Metallothionein-1 expression was statistically significant in histological grade 3 than in grade 1 tumors $p < 0.05$ (Fig. 2). MT-1 expression was statistically significant in breast cancers negative for HER2-, estrogen- and progesterone-receptors in comparison to tumors that were positive for these hormone receptors ($p < 0.05$), (Table 3).

Discussion

Metallothioneins participate in carcinogenesis by mechanisms promoting the development of tumor cells that are more resistant to chemotherapy or radiotherapy[15]. Elevated levels of this protein, with its antioxidant effect, can protect cancer cells against damage from free radicals. This protein has antiapoptotic and pro-proliferative effects, which support uncontrolled cellular growth in breast cancer[18–20].

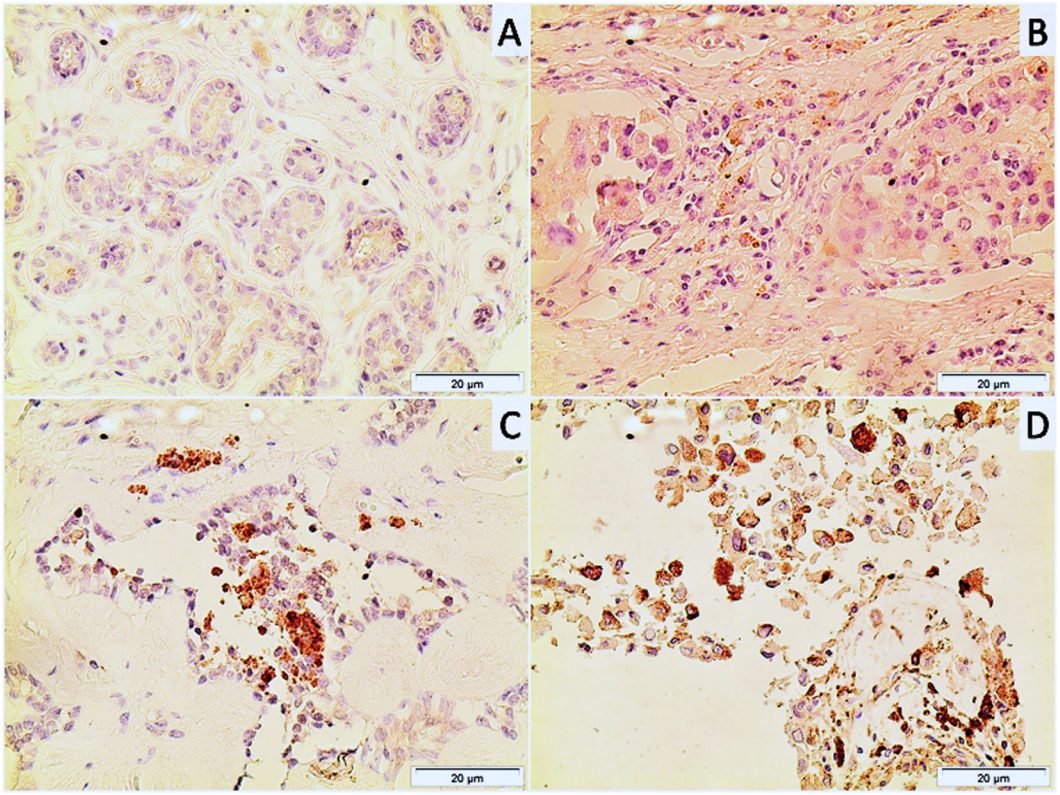


Figure 1. Photomicrographs of histological sections of breast fibroadenoma (**A**), grade 1breast cancer (**B**), grade 2 breast cancer (**C**) and grade 3 breast cancer (**D**). Note the higher concentration of MT-1-stained nuclei in breast cancer cells compared to fibroadenoma cells (original magnification X400).

Characteristic	Group A (control) (n = 36) Mean ± DP	Group B (study) (n = 30) Mean ± DP	p
Age (y)	32.92 ± 9.46	40.37 ± 6.77*	0.0011
Menarche age (y)	12.86 ± 1.16	13.67 ± 1.79	0.0820
WC (cm)	79.40 ± 12.34	83.92 ± 8.92*	0.0480
BMI (kg/m^2)	24.20 ± 4.61	25.70 ± 3.62	0.1540

Table 1. Characteristics of the patients in the study sample. *The mean of cases in group B was statistically significantly higher compared to group A.

Group	n	Mean (%)	SD
Group A (Fibroadenoma)	36	9.10	5.90
Group B (Breast Cancer)	30	26.93*	15.87

Table 2. Mean percentage of Metallothionein nuclei per 500 cells in the control (A) and study (B) groups. *The percentage of cases with positive cells for Metallothionein in group B was statistically significantly higher compared to group A ($p < 0.001$).

There is accumulating evidence that metallothionein is an immunohistochemical biomarker due to its elevated expression in myoepithelial cells of invasive breast carcinoma[12]. However, very few studies have attempted to elucidate the behavior of this protein in fibroadenoma, a benign tumor that does not increase the risk of developing breast cancer[13], and this characteristic makes this condition an ideal control to determine the effect of metallothionein expression on prognosis in breast cancer.

In the current study, overexpression of Metallothionein-1 was observed in cells of breast cancer tissues relative to that in the cells of fibroadenoma tissues. Based on our literature search, only El Sharkawy and Farrag[14] have investigated metallothionein expression in human breast fibroadenomas. According to those authors, higher MT-1 expression is related to more aggressive tumor behavior in ductal breast carcinoma. Other authors have

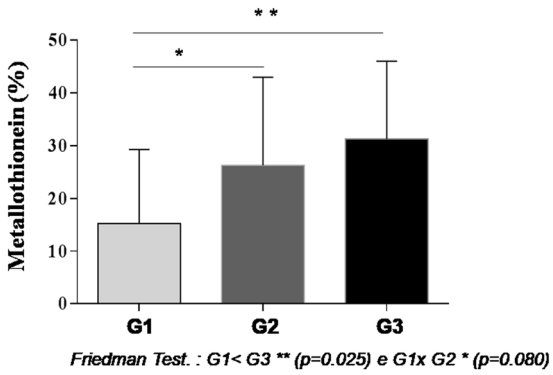


Figure 2. MT-1 expression in different histological grades of ductal invasive breast cancer.

Type of Receptors	Positive Mean ± SD	Negative Mean ± SD	p value*
ER	23.61 ± 15.97	30.24 ± 30.24	0.001
PR	23.12 ± 13.45	31.91 ± 17.88	0.001
HER2	25.97 ± 14.22	27.16 ± 16.53	0.007

Table 3. Metallothionein-1 meanexpression in positive/negative tumors for ER, PR, and Her2. *Teste ANOVA.

provided additional confirmation that a higher nuclear expression of MT-1 is more frequently observed in carcinomas than in benign tumors[15,21].

Furthermore, it is noteworthy that a significant difference was found between the mean age of breast cancer patients and breast fibroadenoma patients. Nevertheless, fibroadenomas are known to be more common in younger women, while breast cancer occurs more frequently in older women[22]. Waist circumference was larger in women with cancer, consistent with the literature, since premenopausal women with excess visceral fat have a higher risk of developing triple-negative breast cancer, which has a relatively worse prognosis[23].

Agresti *et al.*[24] observed that overweight premenopausal patients were at higher risk of developing triple-negative breast cancer than menopausal women. These findings suggest that obesity may play a role in the biological mechanisms underlying more aggressive types of breast cancer and the higher expression of metallothionein[25].

Based on some authors, elevated MT expression blocks cellular apoptosis by sequestering zinc ions that stabilize p53, a gene that acts as a tumor suppressor by inducing apoptosis. Thus, MT enables the maintenance and integrity of the genome[26]. Recent studies indicate a strong relationship between p53 and MT, where overexpression of metallothionein is consistently associated with the presence of mutant p53, and in breast cancer, this relationship has been associated with a smaller number of apoptotic cells and a worse prognosis[27].

Histologic tumor grade is associated with the immunoreactivity of metallothionein in breast cancer in addition to its anti-apoptotic effects. This discovery is consistent with previous observations in invasive breast carcinomas and *in situ* tumors reported by other researchers[10,12]. The current study showed a significant difference in MT-1 expression according to histologic tumor grade. Grade 3 tumors have a higher positivity for MT-1 protein, as well as HER2-overexpressing and negative hormonal receptors breast cancer. The association between these variables is relevant, indicating that metallothionein has a role in the differentiation, proliferation and progression of breast cancers. Proliferation is an important guide for the prognosis and therapy of malignant tumors[28,29].

Therefore, studies have indicated that the expression of MT proteins in ductal breast cancer may represent an unfavorable prognostic index, since its highest expression is related to malignant cells with a higher histologic grade. Nevertheless, there is a need for further studies to obtain a better understanding of the behavior of metallothionein in tumorigenesis and to define the clinical significance of its expression in malignant and benign breast tumors.

Ethical approval. The internal review board of the Federal University of Piauí approved this protocol. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. All the procedures performed in this study complied with current Brazilian laws and were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committees, as well as the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

References

1. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108, https://doi.org/10.3322/caac.21262. (2015).
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cance* **136**, 359–386, https://doi.org/10.1002/ijc.29210. (2015).
3. National Cancer Institute (INCA). Cancer estimates for 2018 in Brazil, http://www.inca.gov.br/estimate/2018.
4. Anderson, K. N., Schwab, R. B. & Martinez, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat* **144**, 1–10, https://doi.org/10.1007/s10549-014-2852-7 (2014).
5. Dowset, M. *et al.* A. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. *Clin. Cancer Res* **12**, 1024s–1030s, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2127. (2006).
6. Duffy, M. J., O'Donovan, N., McDermott, E. & Crown, J. Validated biomarkers: The key to precision treatment in patients with breast cancer. *The Breast* **29**, 192–201, https://doi.org/10.1016/j.breast.2016.07.009. (2016).

7. Ikink, G. J. *et al*. Insertional mutagenesis in a HER2-positive breast cancer model reveals ERAS as a driver of cancer and therapy resistance. *Oncogene* **1**, 1–16, https://doi.org/10.1038/s41388-017-0031-0 (2018).
8. Fan, L. Z. & Cherian, M. G. Potential role of p53 on Metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br J Cancer* **87**, 1019–1026, https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600549 (2002).
9. Lai, Y., Yip, G. W. & Bay, B. H. Targeting metallothionein for prognosis and treatment of breast cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **2**, 178–185 (2011).
10. Bizón., A., Jedryczko, K. & Milnerowicz, H. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer treatment. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **71**, 98–109 (2017).
11. Gomulkiewicz, A. *et al*. Expression of metallothionein 3 in ductal breast cancer. *Int J Oncol* **49**, 2487–2497, https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3759 (2016).
12. Gallicchio, L. M., Flaws, J. A., Fowler, B. A. & Ioffe, O. B. Metallothionein expression in invasive and *in situ* breast carcinomas. *Cancer Detect Prev* **29**, 332–33, https://doi.org/10.1016/j.cdp.2005.06.011 (2005).
13. Shaik, A. N. *et al*. Breast fibroadenomas are not associated with increased breast cancer risk in an African American contemporary cohort of women with benign breast disease. *Breast cancer Ressearch* **20**, 1–8, https://doi.org/10.1186/s13058-018-1027-6 (2018).
14. El Sharkawy, S. L. & Farrag, A. R. H. Mean nuclear area and metallothionein expression in ductal breast tumors: correlation with estrogen receptor status. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **16**, 108–112, https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31806d9b88 (2008).
15. Gumulec, J., Raudenska, M., Adam, V., Kizek, R. & Masarik, M. Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. *PLoS One* **9**, e85346–e85350, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085346 (2014).
16. Wojtczak, B. *et al*. Metallothionein isoform expression in benign and malignant thyroid lesions. *Anticancer Res* **37**, 5179–5185, https://doi.org/10.21873/anticanres.11940 (2017).
17. Hughes, L. E., Mansel, R. E. & Webster, D. J. Aberrations of normal development and involution (ANDI): a new perspective on pathogenesis and nomenclature of benign breast disorders. *Lancet* **2**, 1316–1319 (1987).
18. Cherian, M. G., Jayasurya, A. & Bay, B. H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* **533**, 201–209 (2003).
19. Jin, R., Bay, B. H. & Tan, P. H. Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* **66**, 265–72 (2006).
20. Tai, S. K. *et al*. Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines with different invasive potential: identification of a novel nonsilent metallothionein-1H mutant variant. *Am J Pathol* **163**, 2009–2019, https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63559-6 (2003).
21. Dincer, Z., Jasani, B., Haywood, S., Mullins, J. E. & Fuentealba, I. C. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *J Comp Pathol* **125**, 130–136, https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0488 (2001).
22. Sönmez, K. *et al*. Surgical breast lesions in adolescent patients and a review of the literature. *Acta Chir Belg* **106**, 400–404 (2006).
23. Fagherazzi, G. *et al*. Hip circumference is associated with the risk of premenopausal ER−/PR− breast cancer. *Int J Obes (Lond)* **36**, 431–439, https://doi.org/10.1038/ijo.2011.66 (2012).
24. Agresti, R. *et al*. Association of adiposity, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res Treat* **157**, 179–189, https://doi.org/10.1007/s10549-016-3802-3 (2016).
25. Chen, X. *et al*. Obesity and weight change in relation to breast cancer survival. *Breast Cancer Research and Treatment* **122**, 823–833, https://doi.org/10.1007/s10549-009-0708-3 (2010).
26. Ostrakhovitch, E. A., Olsson, P. E., Jiang, S. & Cherian, M. G. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS letters.* **580**, 1235–1238, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.036 (2006).
27. Ostrakhovitch, E. A., Song, Y. P. & Cherian, M. G. Basal and copper-induced expression of metallothionein isoform 1, 2 and 3 genes in epithelial cancer cells: The role of tumor suppressor p53. *J Trace Elem Med Biol* **35**, 18–29, https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.01.008 (2016).
28. Gomulkiewicz, A. *et al*. Correlation between Metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. *Folia Histochem Cytobiol* **48**, 242–248, https://doi.org/10.2478/v10042-010-0011-5 (2010).
29. Sens, M. A., Somji, S., Garrett, S. H., Beall, C. L. & Sens, D. A. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. *Am J Pathol* **159**, 21–26, https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61668-9 (2001).

Acknowledgements

The authors thank the patients who participated in the current study and the Postgraduate Program of the Federal University of Piauí, Brazil.

Author Contributions

"Sampaio, F.A., Martins, L.M., Escórcio, C.S.D., Revoredo, C.M. and Costa-Silva, D.R." conceived of and designed the study and wrote the final version of the manuscript. "Alves, V.O., Alves-Ribeiro, F.A. and da Silva, B.B." were responsible for conducting the study, statistically analyzing the data and drafting and revising the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

REFERÊNCIAS

AGRESTI, R. et al. Association of adiposity, dysmetabolisms, andinflammation with aggressive e breast câncer subtypes: a cross-sectional study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 157, n.1, p.179-89, 2016.

ALAM, S; KELLEHER, S.L. Cellular Mechanisms of Zinc Dysregulation: A Perspective on Zinc Homeostasis as an Etiological Factor in the Development and Progression of Breast Cancer. **Nutrients,**v. 4, n.1, p. 875-903, 2012.

ALBERT, M. et al. The relationship of breast density in mammography and magnetic resonance imaging in high-risk women and women with breast cancer. **Clin Imaging**, v.39, n.6, p.987-92, 2015.

AMADOU, A. et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D3 and Mammography Density among Mexican Women. **PLoS One**, v.11, n.8, p1-10, 2016.

AMIN, A.L.et al. Benign Breast Disease.**Surg. Clin N**, v.93, n.2, p.299-308, 2013.

ANDERSON, K.N; SCHWAB, R.B; MARTINEZ,M.E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Res Treat,** v.144, n.1, p.1-10, 2014.

BAE, S.Yet al. Differences in prognosis and efficacy of chemotherapy by p53 expression in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment,** v.172, n.2, p.437-444, 2018**.**

BANSAL ,G.J; SANTOSH, D; DAVIES,E.L. Selective magnetic resonance imaging (MRI) in invasive lobular breast cancer based on mammographic density: does it lead to an appropriate change in surgical treatment? **Br J Radiol**, v.89, n.1060, p.1-10, 2016.

BELLAZZO, A. et al. Complexes formed by mutant p53 and their roles in breast cancer. **Breast Cancer - Targets and Therapy,** v.10, n.1, p.101-112, 2018.

BIZÓN, A; JEDRYCZKO, K; MILNEROWICZ, H. Rola metalotioneiny w procesie nowotworzenia oraz w leczeniu chorób nowotworowych.**Postepy Hig Med Dosw** , v. 71, n.1, p.98-109, 2017.

BRAY, F et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA CANCER J CLIN**,v.144, n.8, p.1941-1953, 2018.

BROSH, R; ROTTER, V .When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.10, p.701-13, 2009.

CABIA,B. et al.A role for novel adipose tissue-secretedfactors in obesity-related carcinogenesis.**Obesity reviews,** v.17, n.4, p.361-76, 2016.

CHERIAN, M.G; JAYASURYA.A; BAY B.H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**,v.533, n.1-2, p.201-9, 2003.

CHIMIENTI, F. et al. Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. **Biochem. Pharmacol**, v.62, n.1, p.51-62,2001.

CHUNG, R.S. et al. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. **J. Biol. Chem**, v.283, n.22, p.15349-58, 2008.

CIUREA, A.et al. Fibroadenomas and breast carcinoma: a possible answer to a frequently asked question. A pictorial essay. **Med Ultrason***,* v.20, n.3, p.385-391, 2018.

COATES, A.S. et al. Prognostic interaction between expression of p53 and estrogen receptor in patients with node-negative breast cancer: results from IBCSG Trials VIII and IX. **Breast Cancer Res,** v**.**161, n.3, p.409-420, 2012.

DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **J Cancer**, v.7, n.10, p.1281-94, 2016.

DAVIES, B. et al. Activity of type IV collage- nases in benign and malignant breast disease. **Br. J. Cancer,** v.67, n.5, p.1126-31, 1993.

DAYEM, A. A. et al. The Anti Cancer Effect of Polyphenols against Breast Cancer and Cancer Stem Cells:Molecular Mechanisms. **Nutrients**, v.9, n.9, p.1-10, 2016.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. **CA Cancer J Clin**, v.67, n.6, p.439-448, 2017.

DOWSETT, M et al. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. **Clin. Cancer Res**, v.12, n.3, p.1024s-1030s, 2002.

DOWSETT, M. et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer.**Endocr Relat Cancer,** v.6, n.1, p.25-8,1999.

DUFFY, M.J. et al.Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion

and metastasis. **Breast Cancer Res**, v.2, n.4, p.252-7, 2000.

DZIEGIEL, P et al. Metallothioneins: structure and functions. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v.6, n.1, p.25-82016.

EGWUONWU, O.A. et al.Fibroadenoma: Accuracy of clinical diagnosis in females aged 25 years or less. **Niger J Clin.Pract**., v.19, n.3, p.336-8, 2016.

EL SHARKAWY, S.L ; FARRAG A.R.H. Mean Nuclear Area and Metallothionein Expression in Ductal Breast Tumors: Correlation With Estrogen Receptor Status**. Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.16, n.2, p.108-12, 2008.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality world wide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v.136,n.1, p.359-386 2015.

FJELDHEIM, F.N.et al Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1), daily cycling estrogen and mammographic density phenotypes. **BMC Cancer**, v.16, n.1, p.776, 2016.

GALLICCHIO, L.M et al. Metallothionein expression in invasive and in situ breast carcinomas. **Cancer Detection and Prevention**,v.29, n.1,p.333-337, 2005.

GOMULKIEWICZ, A. et al. Correlation between Metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.48, n.2, p. 242-248, 2010.

GOMULKIEWICZ, A. et al. Expression of Metallothionein 3 In Ductal Breast Cancer. **International Journal Of Oncology**, v.49, n.1, p. 2487-2497,2016.

GORDON, P.B; GAGNON,F.A; LANZKOWSKY, L. Solid breast masses diagnosed as fibroadenoma at fine-needle aspiration biopsy: acceptable rates of growth at long-term follow-up. **Radiology**, v.229, n.1, p.233-8, 2003.

GUMULEC, J. et al. Effect of zinc supplementation on the expression of metallothionein and p53 in musmusculus with induced metastatic breast cancer. Conferência: European Cancer Congress 2013 - 17th ECCO / 38th ESMO / 32nd ESTRO Local: Amsterdam, NETHERLANDS Data: SEP 27-OCT 01, 2013.

GUTIÉRREZ, J.B; SALSAMENDI, A.L. **Fundamientos de ciência toxicológica**. Diaz de Santos, Madrid, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, José Alencar Gomes da Silva. Ministério da saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

JAYASINGHE, Y; SIMMONS, P.S. Fibroadenomas in adolescence. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol**, v.21, n.5, p.402-6, 2009.

KADAM, C.Y.; ABHANG, S.A. Apoptosis Markers in Breast Cancer Therapy.**Adv Clin Chem**, v.74: p.143-93, 2016.

KAUR, N. et al.Clinicopathologic profile of benign breast conditions in Indian Women: prospective study based on aberrations of normal development and involution classification.**World J Surg**,v. 36, n.9, p.2252-8, 2012.

KIM, H.G. et al. Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 andinvasion of breast cancer cells. **FEBS Lett,** v.585, n.1, 421-428, 2011.

KOLAK, A. et al. Primary and secondary prevention of breast cancer. **Ann Agric Environ Med**, v.24, n.4, p.549-553, 2017.

SI, E.U.N. et al. Radiomics of US texture features in differential diagnosis between triple-negative breast cancer and fibroadenoma. **Scientic Reports, v.**8, n.1, p.13546, 2018.

MARGAN, M. M. et al. Molecular Portrait of the Normal Human Breast Tissue and Its Influence on Breast Carcinogenesis.**Breast Cancer** , v.19, n.2, p.99-111, 2016.

MÉPLAN, C; RICHARD, M.J; HAINAUT, P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: Zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. **Oncogene**, v.19, n.46, p.5227-36, 2000.

MINAMOTO, T; MAI, M; RONAI, Z. K-rasmutation: early detection inmolecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers-a review. **Cancer Detect Prev**, v.24, n.1, p.1-12, 2000.

NASSAR, A. et al.Complex fibroadenoma and breast cancer risk: a Mayo Clinic Benign Breast Disease Cohort Study. **Breast Cancer Res Treat**., v.153,n.2:p.397-405, 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (INCA). Cancer estimates for 2018 in Brazil. http://www.inca.gov.br/estimate/2018.

NIU, G; CHEN, X. Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy.**Curr. Drug Targets**, v.11, n.8, p.1000-17, 2010.

OLDENBURG, R. A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol,** v.63, n.2, p.125-49, 2007.

OLIVEIRA, P.A. et al. Chemical carcinogenesis. **An Acad Bras Cienc***,* v.79, n.4, p.593-616, 2007.

OSTRAKHOVITCH, E.A; SONG,Y.P; CHERIAN, M.G. Basal and copper-induced expression of metallothionein isoform 1, 2 and 3 genes in epithelial cancer cells: The role of tumor suppressor p53. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.35, n.1, p.18-29, 2016.

OSTRAKHOVITCH, E.A.et al. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. **FEBS Lett**, v.580, n.5, p.1235-8, 2006.

PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v.26, n.15, p.2157-65, 2007.

RICE, M. S. et al. Mammographic density and breast cancer risk: a mediation analysis. **Breast Cancer Res**, v.18, n.1, p.94, 2016.

ROMIEU, I.I; AMADOU, A; CHAJES, V. The Role of Diet, Physical Activity, Body Fatness, and Breastfeeding in Breast Cancer in Young Women: Epidemiological Evidence. **Rev Invest Clin**, v.69, n.4:p.193-203, 2017.

ROSEN, P.P. **Rosen´s breast pathology**. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Raven. p. 143-55, 2001.

SANTELLA R,M.et al. DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype. **Mutat Res**., v.592, n.1-2, p.29-35, 2005.

SCHON, K; TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast Cancer Res Treat**,v. 16, n.2, p.417-423, 2017.

SILVA, A.G. et al. Li- Fraumeni-like syndrome associated with a large BRCA 1 intrageneticdeletion.**BMC Cancer**, v.12, n.1, p.237, 2012.

TINOCO-VERAS, C.M et al.Analysis of plasma and erythrocyte zinc levels in premenopausal women with breast cancer. **Nutr Hosp.**,v. 26, n.2, p.293-7, 2011.

WANG, X; SIMPSON, E.R; BROWN, K.B. p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis. **Cancer Research**, v.75, n.23, p.5001-7, 2015.

WEN, C. et al. Unifying mechanism in the initiation of breast cancer by metabolism of estrogen (Review). **Mol Med Rep**, v.16, n.2:p.1001-1006, 2017.

WHITE, A.J. et al. Overall and central adiposityandbreast cancer risk in thesisterstudy. **Cancer**, v.121, n.20: p.3700-8, 2015.

WHO ICDO – **3ª: Classificazione Internazionale delle Malattie** per l'Oncologia-TerzaEdizione. InferenzeScarl, Milano, 2005.

YANG, X.et al. Fibroepithelial Tumors of the Breast: Pathologic and Immunohistochemical Features and Molecular Mechanisms **Arch Pathol Lab Med**, v.138:p.25-36, 2014.

ZHANG, J. et al. Detection of serum VEGF and MMP-9 levels by Luminex multiplexed assays in patients with breast infiltrative ductal carcinoma. **Exp Ther Med**, v.8, n.1:p.175-180, 2014.

ZIEMBICKI, S. et al. The Association between Alcohol Consumption and Breast Density: A Systematic Review and Meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.2, n.1, p.170-178, 2017.

3 CAPITULOS

3.1 Capítulo 1



Influência da Metalotioneína no Conteúdo de Zinco e na Atividade da P53 no Câncer de Mama: Uma Revisão Sistemática

Artigo submetido para o periódico Biometals

Journal ISSN: 0966-0844 (Print), 1572-8773 (Online)

JCR 2017/2018: 2.478

QUALIS CAPES: B1 em Biotecnologia

Influence of Metallothionein on Zinc content and p53 Activity on Breast Cancer: A Systematic Review

Influência da metalotioneína no teor de zinco e na atividade da p53 no câncer de mama: uma revisão sistemática

Fabiane Araújo Sampaio[1]; Juliana Soares Severo[2]; Jennifer Beatriz Silva Morais[2]; João Paulo da Silva-Sampaio[1]; Dilina do Nascimento Marreiro2; Benedito Borges da Silva[1]

1Programa de Pós-Graduação da Rede de Biotecnologia do Nordeste (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí 64049-550, Brasil.

[2]Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, campus Ministro PetrônioPortela, Ininga, Teresina, Piauí, Brasil.

Autor correspondente:

FabianeAraújoSampaio

Av. Frei Serafim, 2280, UFPI

64001-020 Teresina, Piauí, Brasil

Telefone: +55 86 3232 5063

Email: fabianesampaio21@gmail.com

ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9449-5045

Sampaio FA e Severo JS participaram da redação e revisão do manuscrito; Marreiro DN e da Silva BB supervisionaram o trabalho, participaram da redação e da revisão do trabalho.

Contagem de palavras: 2900

Figuras: 1

Tabelas: 2

RESUMO

Objetivo: A presença de tumores mamários induz alterações na distribuição do zinco que pode ser devido ao aumento da expressão de metalotioneína, uma proteína carreadora de zinco, que sob condições de deficiência desse mineral pode sequestrar, removendo-o da proteína p53, responsável pelo genoma integridade e apoptose das células, permitindo assim a proliferação celular. Métodos: A pesquisa foi conduzida selecionando estudos que avaliaram a interação da atividade da metalotioneína, zinco e p53 ou expressão gênica, realizada nas bases de dados PubMed, SciVerse Scopus e Web of Science, de 07 a 18 de julho de 2018. A estratégia de busca aplicou os seguintes termos de pesquisa: "cancro da mama", "neoplasmas da mama", "zinco", "metalotioneína", "proteína supressora de tumor p53" e "genes, p53". Após a seleção e remoção dos artigos duplicados, sete deles foram identificados como elegíveis para esta revisão sistemática, a qual foi conduzida de acordo com as recomendações do "PRISMA". Resultados: Dois dos sete estudos mostraram associação entre zinco e p53. Em relação à interação metalotioneína e p53, os resultados foram controversos.Conclusões: As pesquisas avaliadas nesta revisão não mostraram qualquer relação entre zinco, metalotioneína e p53, quando as três foram avaliadas em conjunto, mas revelaram interações entre esses biomarcadores quando avaliadas em pares . No entanto, novos estudos in vitro ou in vivo ainda são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nainfluência da metalotioneína na homeostase do zinco e suas repercussões na modulação da atividade da p53 e na progressão do câncer de mama.

Introdução

O câncer de mama resulta do acúmulo progressivo de mutações na estrutura e / ou função do material genético, que induz a multiplicação e propagação descontrolada das células da mama (Pavithra et al. 2015; Mendes et al. 2018). Estudos sobre o assunto mostraram a importância do gene p53 e suas mutações na patogênese do câncer de mama (Blanden et al. 2015; Fan e Cherian 2002). O gene supressor de tumor p53 codifica a proteína p53, que se liga ao DNA através da coordenação do bloqueio do ciclo celular, reparação do

DNA e promoção da apoptose (Xu et al. 2014). Incidentalmente, é importante mencionar que a estabilidade dos sítios de ligação da proteína p53 ao DNA é mantida através da ligação de alguns minerais, sendo um deles o zinco (Blanden et al. 2015; Murata et al. 2015).

No entanto, o zinco pode desempenhar um papel significativo na disfunção e proliferação celular (Cruz et al. 2015; Marreiro et al. 2017). No câncer de mama, há um aumento na expressão de proteínas transportadoras de zinco, como a metalotioneína (MT), que atua na captação, efluxo e compartimentalização do zinco, transportando zinco do entorno extracelular ou vesículas intracelulares para o citoplasma, contribuindo para a baixa disponibilidade mineral no núcleo celular e disfunção do p53 (Rezk et al. 2015).

Assim, a alta expressão de metalotioneína está constantemente associada à presença de mutação no gene p53 e aumentando em grau tumoral, uma vez que sob condições de deficiência de zinco no citoplasma, a metalotioneína pode sequestrar o mineral que está ligado ao gene p53 no núcleo da célula. citoplasma da célula tumoral e reduzir a atividade de transcrição da p53, o que leva a um desequilíbrio no domínio de ligação e conformação do DNA (Araújo et al. 2015; Formigari et al. 2013).

Portanto, o objetivo deste estudo foi detalhar, em uma revisão sistemática, os estudos observacionais disponíveis nas bases de dados que investigaram a influência da metalotioneína no conteúdo de zinco nas células tumorais e, consequentemente, na atividade da p53 ou expressão gênica no câncer de mama.

Métodos

Fontes de dados e seleção de estudos

A pesquisa foi realizada nas seguintes bases de dados: PubMed, SciVerse Scopus e Web of Science, de 07 a 18 de julho de 2018, por dois autores (FA e JS) de forma independente. As pesquisas realizadas foram comparadas e verificadas para garantir a equivalência na seleção e análise dos artigos.

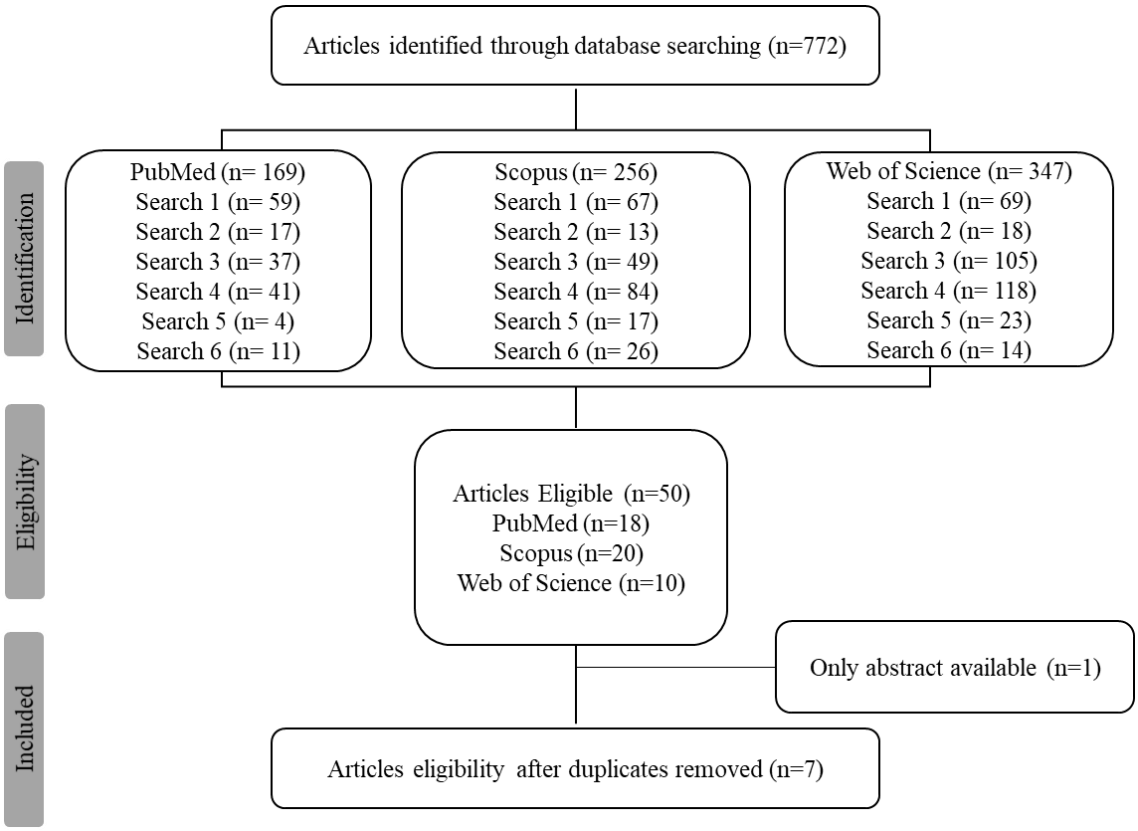
A estratégia PECO (paciente, exposição, comparação e desfechos) foi

usada para definir a questão norteadora desta revisão (pode a metalotioneína influenciar o conteúdo de zinco no núcleo das células do câncer de mama e diminuir a atividade ou expressão da p53?). As palavras-chave "câncer de mama", "neoplasias mamárias", "zinco", "metalotioneína", "proteína supressora de tumor p53" e "genes, p53" foram utilizadas no levantamento bibliográfico.

O seguinte cruzamento dos descritores foi realizado na busca de artigos: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (zinco) e (proteína supressora de tumor p53); (cancro da mama OU neoplasmas da mama) e (metalotioneína) e (proteína supressora de tumores p53); (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (zinco) e (metalotioneína); (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (zinco) e (genes, p53); (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (metalotioneína) e (genes, p53); (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (proteína supressora de tumor p53) e (genes, p53).

Esses termos foram pesquisados no resumo, título ou como palavras-chave. Os critérios de inclusão para seleção do estudo incluíram artigos relatados na língua inglesa, disponíveis na íntegra ou apenas resumo, sem limite de ano de publicação, que analisaram metalotionina e seus efeitos sobre o zinco e a proteína supressora de tumor p53 ou gene p53. O processo de seleção do estudo foi mapeado de acordo com as diretrizes Preferred Reporting Items for Systematic Reviews e Meta-Analyzes (PRISMA) (Moher et al. 2009) e pode ser visto na figura 1. Os artigos de revisão não foram incluídose os detalhes da seleção dos estudos são mostrados na figura 1.

Figura 1: Diagrama de fluxo da seleção do estudo.



Legenda:
Pesquisa 1: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (zinco) e (proteína supressora de tumor p53); Pesquisa 2: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (metalotioneína) e (proteína supressora de tumor p53); Pesquisa 3: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (zinco) e (metalotioneína); Pesquisa 4: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (zinco) e (genes, p53); Pesquisa 5: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (metalotioneína) e (genes, p53); Pesquisa 6: (câncer de mama OU neoplasias de mama) e (proteína supressora de tumor p53) e (genes, p53).

As características do estudo, como autores, ano de publicação, linhagem celular, tipo de célula, métodos de p53, avaliação de metalotioneína e zinco, bem como desfechos do estudo podem ser visualizados na tabela 1 e 2.

Resultados

Artigos selecionados

Um total de 772 artigos foram identificados através dos bancos de dados PubMed (n = 169), SciVerse Scopus (n = 256) e Web of Science (n = 347). Após a seleção e remoção de artigos duplicados, 7 artigos foram identificados como elegíveis para esta revisão sistemática. A Tabela 1 mostra as características dos artigos incluídos.

Recursos de itens incluídos

A Tabela 1 e 2 apresentam um resumo dos resultados dos artigos revisados. Não foram encontrados ensaios clínicos e estudos observacionais em humanos que reúnam os três parâmetros. Os artigos encontrados foram apenas estudos de linhagem celular e estudos experimentais em modelos animais.

Cinco de sete estudos utilizaram apenas linhas celulares (Méplan et al. 2000; Provinciali et al. 2002; Ostrakhovitch et al. 2006; Ostrakhovitch et al. 2007; Puca et al. 2009). Quatro artigos utilizaram linhas celulares humanas (Méplan et al. 2000; Ostrakhovitch et al. 2006; Ostrakhovitch et al. 2007; Puca et al. 2009). Um estudo utilizou apenas linhas celulares animais (Proviciali et al., 2002). Dois dos sete estudos utilizaram modelos animais e cultura de células para mostrar a interação entre p53, metalotioneína e zinco (Gumulec et al. 2013; Sztalmachova et al. 2015).

Interações entre zinco, metalotioneína e p53

Dois dos sete estudos relataram que o zinco aumenta a expressão ou atividade da p53 (Provinciali et al. 2002; Puca et al. 2009). Dois outros estudos não mostraram nenhuma influência da exposição ao zinco na atividade da p53 (Ostrakhovitch et al. 2006; Sztalmachova et al. 2015) e três estudos não avaliaram a relação entre a exposição ao zinco e a atividade da p53 (Méplan et al. 2000; Ostrakhovitch et al. 2007, Sztalmachova et al. 2015).

Na relação entre o zinco e a metalotioneína, pode-se observar que quatro dos sete estudos descobriram que a exposição ao zinco aumenta os níveis de mRNA da metalotioneína ou da metalotioneína nas células tumorais (Provinciali et al. 2002; Ostrakhovitch et al. 2006; Gumulec et al. 2013). Um estudo não encontrou correlação entre as concentrações de zinco e a expressão de MT1 ou MT2 (Sztalmachova et al. 2015). Os dois estudos restantes não relataram interações entre zinco e metalotioneína (Méplan et al. 2000; Gumulec et al. 2013).

Em relação à interação entre metalotioneína e p53, os estudos mostraram resultados controversos. Méplan et al. (2000) descobriram que a metalotioneína pode aumentar a atividade de transcrição do gene p53;

entretanto, sob condições de superexpressão dessa proteína, houve uma redução de 50% na atividade de transcrição do p53. Ostrakhovitch et al. (2006) e Ostrakhovitch et al. (2007) observaram que a metalotioneína e p53 podem interagir ou se ligar uns aos outros. Por outro lado, Puca et al. (2009) descobriram que o knockdown de metalotioneína pode restaurar a atividade transcricional da p53.

Ao avaliar os três biomarcadores associados, Ostrakhovitch et al. (2007) descobriram que a regulação da metalotiona induzida pela exposição ao zinco requer a presença de um p53 ativo e que a alta concentração de metalotioneína nas células deficientes em p53 não é resultado da modulação das concentrações intracelulares de zinco. Ostrakhovitch et al. (2006) e Sztalmachova et al. (2015) não encontraram relatos de zinco, metalotioneína e gene ou proteína p53. Os demais estudos não descreveram interações de zinco, metalotioneína e p53 juntas. Outros resultados encontrados nesta revisão foram relatados por Provinciali et al. (2002), onde o zinco foi relacionado à apoptose e por Gumulec et al. (2013) e Sztalmachova et al. (2015), que descobriram que a exposição ao zinco é capaz de reduzir o tamanho do tumor.

Tabela 1 Características dos estudos experimentais em linhagens celulares humanas incluídos nesta revisão.

Authors, publication year	Cell line/type	Gene/protein p53analysis	Metallothionein analysis	Zinc analysis	Outcomes
HUMAN CELL LINES STUDIES					
Méplan, Richard, Hainut, 2000	Human breast carcinoma cell line MCF7	Wild-type human recombinant p53 produced in Sf9 infected cells using a baculovirus expression system; p53 DNA sequence was extract by EMSA	Murine 10.1 fibroblasts were co-transferred by the calcium phosphate method containing BPV-MTIIA plasmid expressing human MT-IIA	Zn was incorporated in p53 by a scintillation buffer and the amount of Zn was quantified using a gamma counter	Incorporation of Zn within p53 structure is required for p53 folding in a DNA-binding conformation; MT induced a statistically significant threefold increase in p53 transcriptional activity; When in large excess, MT reduced the transcriptional activity of p53 by an average of 50%.
Ostrakhovitch et al., 2006	Human breast cancer epithelial cell line MN-1 and MDD2 cell line	GST-tagged p53 protein was attached to glutathione-sapharose beads and incubated with purified rabbit liver MT1 in binding buffer and isolated by Western blot analysis using anti-p53 or anti-MT antibodies	Apo-MT was prepared by gel-filtration chromatography. MT protein concentration was determined by spectrophotometry	Zn was analyzed by atomic absorption spectrophotometry	There was an increase in MT levels after Zn exposure; p53 and MT can form a complex in epithelialbreast cancer cells, with and without Zn treatment, irrespective of their p53 status; Only Apo-MT was able to bind to immobilized GST-wt-p53; The interaction of purified Cd, Zn-MT with wt-p53 was not detected.

Ostrakhovitch et al., 2007	Human breast cancer epithelial cell line MCF-7, ER+ with wt-p53, MDN1 cell line and MDD2 cell line	p53-CMV-TnT expression vector was constructed using human p53 gene product.	MT-I was determined by Western blot analysis and immunofluorescence using anti-MT antibodies	Zn was analyzed by atomic absorption spectrophotometry	Zinc was capable of inducing MT expression; Regulation of MT by Zn requires the presence of an active p53 and that high basal level MT in p53 deficient cells is not due to modulation in intracellular concentration of zinc.
Puca et al., 2009	Human breast cancer cell line MCF7	p53 was determined by Western blot analysis using anti-p53 antibodies and for conformational study was conducted immunoprecipitation assay	MT-IIA was determined by RT-PCR	$ZnCl_2$ were added to the cell culture medium	Knockdown of MT2A restored p53 transactivation activity; Zinc supplementation restored p53transcription activity and drug-induced apoptosis;

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2. Características dos estudos experimentais em linhagens celulares de camundongos incluídos nesta revisão.

Authors, publication year	Cell line/type	Gene/protein p53 analysis	Metallothionein analysis	Zinc analysis	Outcomes
MOUSE CELL LINES AND EXPERIMENTAL STUDIES					
Provinciali et al., 2002	TS/A (H-2^{d}) mammary adenocarcinoma cells of BALB/c mouse	p53 was determined by RT-PCR from TS/A cultured cells	MT-I was determined by RT-PCR from TS/A cultured cells	Zn content in tumor cells was determined by atomic absorption spectrophotometry	Zn-treated tumor cells died via apoptosis; MT mRNA was constitutively expressed in TS/A tumor cells and was only faintly increased after overnight incubation with Zn; A significantly greater expression of mRNA for p53 was shown after 4 and 8 h of incubation with Zn;
Gumulec et al., 2013	4T1 metastatic breast cancer cell lineof BALB/c mouse	p53 was quantified by qRT-PCR	MT was quantified by qRT-PCR	0.15 mg/g Zn sulphate were injected divided in 4 doses in mouses	Tumor size of Zn-treated animals was 40% smaller in the end of experiment; When Zn-treated, MT level increased up to the level of healthy controls;
Sztalmachova et al., 2015	4T1 murine mammary carcinoma cell line of BALB/c mouse	p53 was quantified by qRT-PCR	MT was quantified by qRT-PCR	The 4T1 cells were treated with zinc sulphate(0-100 μM) in fresh medium for 48 h.A total amount of 0.15 mg/gof zinc sulphate divided into 4 doses was applied to the miceintraperitoneally.Electrochemicalanalyser Model Metrohm AG wasused for the determination of Zn(II).	Tumourreduction up to 28% was observed in the zinc-treated subjects; No correlation between MT1or MT2 expression and zinc sulphate concentration was found; No significant change inMT1, MT2 and TP53 gene expression was found in thetumor tissue after Zinc(II) exposure.

Discussão

Esta revisão sistemática foi conduzida com a perspectiva de investigar a potencial influência da metalotioneína no conteúdo de zinco em células de câncer de mama e sua relação com a atividade ou expressão do gene p53. A maioria dos estudos avaliados mostrou resultados controversos na interação de metalotioneína e zinco com o gene ou proteína p53.

Em relação ao zinco e à metalotioneína, a maioria dos estudos mostrou o papel do zinco em aumentar a expressão gênica ou a quantidade dessa proteína nas linhagens celulares estudadas. Esses resultados são consistentes com a literatura, uma vez que o papel do zinco como potente indutor de metalotioneína está bem estabelecido (Marreiro et al. 2017).

Um ponto importante a ser destacado nesta discussão são as discordâncias nos métodos de exposição a minerais, bem como o uso de diferentes linhagens celulares ou modelos animais, o tempo e o procedimento de exposição ao mineral, e os diferentes métodos de determinação das variáveis estudadas. Além disso, a ausência dessa comparação em alguns estudos, ode ter contribuído para as divergências observadas. Dados de algumas pesquisas mostraram que a exposição ao zinco parece restaurar as funções do gene supressor de tumores p53 in vitro (Puca et al. 2011; Margalit et al. 2012). Este comportamento parece ser em virtude da presença do sítio de ligação a um íon zinco na estrutura da proteína p53, que é necessária para a estrutura e função adequadas dessa proteína (Kogan et al. 2018).

Os resultados dos estudos incluídos nesta revisão sistemática também mostraram dados sobre o efeito da exposição das células ao zinco na redução do tamanho do tumor. Esse fato pode ser devido à relação do zinco com o

processo de apoptose, possivelmente pela regulação da função da p53, que está envolvida nesse processo (Kocdor et al. 2015; Seth et al. 2015). É importante ressaltar que o aumento da expressão de metalotioneína 2A e ZnT2 na luz do tumor é um mecanismo que previne o acúmulo excessivo de zinco nessas células e, portanto, pode proteger as células tumorais contra a apoptose ocasionada pelo aumento das concentrações de zinco (Larner et al. 2015; Bostanci et al. 2016).

Por outro lado, a deficiência desse mineral também pode levar à apoptose, através da translocação da proteína p53 fosforilada para a mitocôndria, levando ao aumento da proteína pró-apoptótica BAX e à perda do potencial de membrana nessa organela, o que favorece o efluxo do fator indutor de apoptose (AIF) e sua translocação para o núcleo com aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (Seth et al. 2015).

Outro aspecto relevante diz respeito ao possível papel do zinco no crescimento do tumor mamário. Nesse sentido, o câncer de mama parece alterar a expressão das proteínas transportadoras desse mineral, como Zip 5, 6, 7, 8 e 10, ZnT2 e metalotioneína, levando à sua deficiência no soro e compartimentalização dentro das células tumorais. Essas mudanças no metabolismo do zinco favorecem a ativação de metaloproteinases, angiogênese e metástase (Larner et al. 2015; Kim et al. 2011; Kelleher et al. 2011; Taylor et al. 2007).

Em relação à interação entre metalotioneína e p53, estudos mostraram que a metalotioneína pode aumentar a atividade da proteína ou expressão do gene p53, o que pode ser devido ao fato de que a metalotioneína está envolvida na homeostase do zinco e serve como um suprimento desse mineral

para a otimização de atividade de p53. Outra característica desse mineral é que ele também atua como regulador da expressão gênica e defesa antioxidante celular (Fan e Cherian, 2002; Marreiro et al., 2017).

Por outro lado, o excesso de metalotona pode também reduzir ou inibir a atividade da p53, pois essa metaloproteína pode romper a arquitetura do DNA no domínio de ligação da p53 devido à sua alta afinidade com os íons de zinco (necessários para essa ligação) (Alam e Kelleher 2012). No entanto, os estudos incluídos nesta revisão sistemática não mostraram dados conclusivos sobre o papel da metalotioneína na distribuição de zinco dentro de células tumorais e sua relação com a atividade ou expressão do mRNA do p53. Os três estudos que avaliaram a associação entre todos os biomarcadores mencionados não encontraram resultados significativos.

Uma possível explicação para a falta de associação entre esses resultados refere-se às limitações dos estudos avaliados, em especial pela falta de padronização dos protocolos utilizados ou tempo insuficiente nos estudos para observar efeitos significativos. Outra limitação que deve ser mencionada envolve a possibilidade de que artigos relevantes não tenham sido incluídos por terem sido publicados em um idioma diferente do inglês ou em fontes não indexadas nas bases de dados eletrônicas acessadas.

Conclusão

Os resultados dessa revisão sistemática fornecem evidências sobre o papel do zinco como indutor da metalotioneína, assim como na função da proteína p53. Os achados mostram também uma relação entre a metalotioneína e a proteína p53, porém quando os biomarcadores, zinco, metalotioneína e p53 foram avaliados em conjunto no câncer de mama não

houve relação significativa. Novos estudos em linhagens de células ou modelos animais ainda são necessários para elucidar os mecanismos moleculares da atuação do zinco na prevenção contra o câncer de mama ou seu papel na progressão dessa doença, bem como a padronização dos protocolos utilizados.

Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

REFERÊNCIAS

1. Pavithra V, Sathisha TG, Kasturi K, Mallika DS, Amos SJ,Ragunatha S (2015) Serum levels of metal ions in female patientswith breast cancer. J ClinDiagn Res 9(1):25–27.
2. Mendes PMV, Bezerra DLC, Santos LR, Santos RO, Melo SRS, Morais JBS, Severo JS, Vieira SC, Marreiro DN.Magnesium in Breast Cancer: What Is Its Influence on the Progression of This Disease?Biol Trace Elem Res. 2018 Aug;184(2):334-339. doi: 10.1007/s12011-017-1207-8.
3. Blanden AR, Yu X, Wolfe AJ, Gilleran JA, Augeri DJ, O'Dell RS, et al. Synthetic Metallochaperone ZMC1 Rescues Mutant p53 Conformation by Transporting Zinc into Cells as an Ionophore. MolPharmacol. 2015; 0–6.
4. Fan, L. Z., Cherian, M. G. (2002). Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. British journal of cancer, 87(9), 1019.
5. Xu, B., Wang, W., Guo, H., Sun, Z., Wei, Z., Zhang, X., et al. (2014). Oxidative stress preferentially induces a subtype of micronuclei and mediates the genomic instability caused by p53 dysfunction. Mutation

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 770, 1-8.

6. Murata, A., Ito, Y., Kashima, R., Kanbayashi, S., Nanatani, K., Igarashi, C., Okumura, M., Inaba, K., Tokino, T., Takahashi, S., Kamagata, K (2015) One-Dimensional Sliding of p53 Along DNA Is Accelerated in the Presence of Ca 2+ or Mg 2+ at Millimolar Concentrations. J Mol Biol 427, 2663–2678. doi:10.1016/j.jmb.2015.06.016
7. Cruz KJC; Oliveira ARS, Marreiro DN. Antioxidant role of zinc in diabetes mellitus. World J. Diabetes 2015, 6, 333–337.
8. Marreiro DD, Cruz KJ, Morais JB, Beserra JB, Severo JS, de Oliveira AR.Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms.Antioxidants (Basel). 2017 Mar 29;6(2). pii: E24. doi: 10.3390/antiox6020024.
9. Rezk NA, Zidan HE, Riad M, Mansy W, Mohamad SA. Metallothionein 2A expression and its relation to different clinical stages and grades of breast cancer in Egyptian patients. Gene. 2015 Oct 15;571(1):17-22. doi: 10.1016/j.gene.2015.06.035.
10. Araújo CGB, Holanda AON, Rocha CVS, Nascimento APS, Revoredo CMS, Silva BB, et al. (2015). Relationship between zincemia, superoxide dismutase activity and marker of oxidative stress inwomen with breast cancer. NutrHosp 2015;32:785–91. doi:10.3305/nh.2015.32.2.9204
11. Formigari A, Gregianin E, Irato P. The effect of zinc and the role of p53 in copper-induced cellular stress responses. J ApplToxicol. 2013 Jul;33(7):527-36.

12. Moher A, Liberati J, Tetzlaff DG (2009) Altman PRISMA group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. BMJ 339:b2535. doi:10.1136/bmj.b2535
13. Méplan, C., Richard, M.-J., Hainaut, P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: Zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. Oncogene, 19(46), pp. 5227-5236, 2000.
14. Provinciali, M., Donnini, A., Argentati, K., (...), Bartozzi, B., Bernardini, G. Reactive oxygen species modulate Zn2+-induced apoptosis in cancer cells. Free Radical Biology and Medicine 32(5), pp. 431-445, 2002.
15. Ostrakhovitch EA, Olsson PE, Jiang S, Cherian MG. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. FEBS Lett. 2006 Feb 20;580(5):1235-8. Epub 2006 Jan 20.
16. Ostrakhovitch EA, Olsson PE, von Hofsten J, Cherian MG. P53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells. J Cell Biochem. 2007 Dec 15;102(6):1571-83.
17. Puca R, Nardinocchi L, Bossi G, Sacchi A, Rechavi G, Givol D, D'Orazi G. Restoring wtp53 activity in HIPK2 depleted MCF7 cells by modulating metallothionein and zinc. Exp Cell Res. 2009 Jan 1;315(1):67-75. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.10.018.
18. Gumulec, J.; Sztalmachova, M.; Polanska, H.; et al. Effect of zinc supplementation on the expression of metallothionein and p53 in musmusculus with induced metastatic breast cancer. Conferência: European Cancer Congress 2013 - 17th ECCO / 38th ESMO / 32nd

ESTRO Local: Amsterdam, NETHERLANDS Data: SEP 27-OCT 01, 2013.

19. Sztalmachova M, Gumulec J, Raudenska M, Polanska H, Holubova M, Balvan J, Hudcova K, Knopfova L, Kizek R, Adam V, Babula P, Masarik M. Molecular response of 4T1-induced mouse mammarytumoursandhealthytissuestozinctreatment. Int J Oncol. 2015 Apr;46(4):1810-8. doi: 10.3892/ijo.2015.2883. Epub 2015 Feb 9.
20. Puca R, Nardinocchi L, Porru M, Simon AJ, Rechavi G, Leonetti C, Givol D, D'Orazi G.Restoring p53 active conformation by zinc increases the response of mutant p53 tumor cells to anticancer drugs.Cell Cycle. 2011 May 15;10(10):1679-89.
21. Margalit, O., Simon, A. J., Yakubov, E., Puca, R., Yosepovich, A., Avivi, C, et al. (2012). Zinc supplementation augments in vivo antitumor effect of chemotherapy by restoring p53 function. International journal of cancer, 131(4), E562-E568.
22. Kogan S, Carpizo DR. Zinc Metallochaperones as Mutant p53 Reactivators: A New Paradigm in Cancer Therapeutics. Cancers (Basel). 2018 May 29;10(6). pii: E166. doi: 10.3390/cancers10060166.
23. Kocdor H, Ates H, Aydin S, Cehreli R, Soyarat F, Kemanli P, Harmanci D, Cengiz H, Kocdor MA.Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer.Drug Des DevelTher. 2015 Jul 27;9:3899-909. doi: 10.2147/DDDT.S87662. eCollection 2015.
24. Seth R, Corniola RS, Gower-Winter SD, Morgan Jr. TJ, Bishop B, Levenson CW. Zinc deficiency induces apoptosis via mitochondrial p53-

and caspase-dependent pathways in human neuronal precursor cells.J Trace ElemMed Biol. 2015 Apr;30:59-65.

25. Larner, F., Woodley, L. N., Shousha, S., Moyes, A., Humphreys-Williams, E., Strekopytov, S. et al. (2015). Zinc isotopic compositions of breast cancer tissue. Metallomics, 7(1), 112-117.
26. Bostanci Z, Mack RP Jr, Enomoto LM, Alam S, Brown A, Neumann C, Soybel DI, Kelleher SL. Marginal zinc intake reduces the protective effect of lactation on mammary gland carcinogenesis in a DMBA-induced tumor model in mice. Oncol Rep. 2016 Mar;35(3):1409-16.
27. Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH, et al. Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 andinvasion of breast cancer cells. FEBS Lett. 2011; 585(2):421-8.
28. Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V. Zinc in specializedsecretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. AdvNutr. 2011; 2(2):101-106.
29. Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellia IO, et al.The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breastcancer. Mol Med. 2007; 13(7-8):396-406.
30. Alam S, Kelleher SL. Cellular Mechanisms of Zinc Dysregulation: A Perspective on Zinc Homeostasis as an Etiological Factor in the Development and Progression of Breast Cancer. Nutrients. 2012;4(12):875–903.

3.2 Capítulo 2

Estudo Caso-Controle da Expressão da Metalotioneína-1 em Cancer De Mama E Fibroadenoma

Artigo aceito pelo Scientifc Reports após correções recomendadas pelos revisores

ISSN: 0163-4984 (Print), 1559-0720 (Electronic)

JCR 2016/2017: 4.122

QUALIS CAPES: A1 em Biotecnologia

A case-control study of Metallothionein-1 expression in breast cancer and breast fibroadenoma

**Fabiane Araújo Sampaio[1], Luana Mota Martins[1], Carla Solange de Melo Escorcio Dourado[1], Camila Maria Simplício Revoredo[1], Danylo Rafhael Costa-Silva[1], Victor Alves de Oliveira[2], Francisco Adelton Alves-Ribeiro[1], Benedito Borges da Silva[1].*

[1]Postgraduate Program, Northeast Biotechnology Network (*RENORBIO*), Federal University of Piauí, Teresina, Piaui 64000-020, Brazil.
[2] Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí 64000-020, Brazil.

Institutional email following the authors' order:
fabianesampaio21@gmail.com
Lua_mota@gmail.com
csmdourado@gmail.com
camilarevoredo@ufpi.edu.br
danylorafhael@hotmail.com
victor_oliveira_alves@hotmail.com
adelton@ifma.edu.br
beneditoborges@globo.com
***Corresponding author:**
Fabiane Araújo Sampaio
Avenida Universitária, S/N, UFPI
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Ininga
64049550 Teresina, Piauí, Brazil
Phone: +55 86 3217-3331
e-mail: fabianesampaio21@gmail.com
ORCID: 0000-0002-9449-5045

RESUMO

A superexpressão de metalotioneína-1 (MT-1) pode desempenhar um papel importante no câncer de mama; no entanto, poucos estudos compararam a expressão de MT-1 entre câncer de mama e fibroadenoma. Um estudo transversal controlado foi realizado em 66 mulheres na pré-menopausa, com idades entre 20-49 anos, que tinham sido histologicamente diagnosticadas com fibroadenoma de mama ou câncer de mama. Os pacientes foram divididos em dois grupos: grupo A, controle (fibroadenoma, n = 36) e grupo B, estudo (câncer de mama, n = 30). A imunohistoquímica foi realizada em amostras de tecido de fibroadenoma e pacientes com câncer de mama para avaliar a expressão de metalotioneína usando um anticorpo policlonal anti-MT-1 (coelho policlonal anti-metalotioneína - Número de catálogo biorbyt-orb11042) em uma diluição de 1: 100. Os dados foram analisados utilizando o ANOVA ($p < 0,05$). A análise microscópica mostrou uma maior concentração de núcleos anti-MT-1 em tecidos de câncer de mama do que nos tecidos de fibroadenoma. A proporção média de células com núcleos anti-MT-1 foi de 26,93% e 9,10%, respectivamente, nos grupos estudo e controle ($p < 0,001$). Os tumores grau 3 histológicos apresentaram uma expressão significativamente maior de MT-1 do que o grau hitológico 1 ($p < 0,05$), enquanto os tumores de mama negativos para receptores de estrógeno, progesterona e HER2 apresentaram uma expressão de MT-1 significativamente maior que os positivos para esses parâmetros ($p < 0,05$). A proteína MT-1 em mulheres em idade reprodutiva foi significativamente maior no câncer de mama do que no fibroadenoma neste estudo. Além disso, houve maior imunorreatividade de MT-1 em tumores mais agressivos.

Palavras-chave: Câncer de mama. Fibroadenoma. Metalotioneína. Imunohistoquímica.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum que afeta as mulheres nos países ocidentais e é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo [1,2]. No Brasil, foram estimados 59.700 novos casos de câncer de mama para o ano de 2018, com risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres [3]. Embora o exame físico e a mamografia sejam importantes para garantir o diagnóstico precoce da doença e reduzir a mortalidade, o câncer de mama ainda é freqüentemente diagnosticado em estágio avançado no Brasil. Como resultado, as taxas de mortalidade são altas mesmo com as estratégias terapêuticas atuais [4].

No entanto, tem sido sugerido que estratégias terapêuticas e prognósticas mais adequadas no câncer de mama podem ser desenvolvidas usando biomarcadores protéicos, como a metalotioneína. Esta proteína tem a vantagem de não só interferir com a apoptose e proliferação celular, mas também sofrer alterações bem antes da ocorrência de alterações tumorais clínicas [5] e, portanto, pode orientar melhor as estratégias de tratamento e prognóstico [6,7]. A metalotioneína (MT) é uma proteína que tem sido amplamente estudada como marcador prognóstico de câncer de mama, pois reduz a apoptose, proliferação e diferenciação de células tumorais malignas, tornando-as mais resistentes ao tratamento [8-10]. Estudos sugerem que a superexpressão da metalotioneína está associada a tumores de mama mais agressivos e a doenças mais avançadas [11-14].

Alguns estudos mostraram que o aumento da expressão de MT está associado a um maior potencial proliferativo em vários tipos de câncer e uma progressão mais rápida da doença, bem como a resistência celular à quimioterapia e radioterapia [15,16]. No entanto, há uma escassez de estudos avaliando a expressão imunohistoquímica da MT no câncer de mama e, de acordo com o nosso conhecimento, apenas um estudo publicado na literatura comparou a expressão de MT-1 entre mulheres com câncer de mama e mulheres com fibroadenoma. [14]. Além disso, o fibroadenoma não se classifica como um tumor por alguns autores, mas considera-se como uma aberração do desenvolvimento normal em involução (ANDI) [17]. Portanto, a

concepção do presente estudo foi motivada pela escassez de estudos que compararam a expressão de MT-1 entre fibroadenoma e câncer de mama.

PACIENTES E METÓDOS

DESENHO DO ESTUDO

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CAAE: 43447015.8.0000.5214). Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado antes do início do estudo. Trata-se de um estudo transversal de caso-controle envolvendo pacientes atendidos no Ambulatório de Mama do Hospital Getúlio Vargas, Universidade Federal do Piauí, Brasil, de outubro de 2014 a outubro de 2016. O tamanho da amostra foi calculado e 71 pacientes necessários para o estudo. No entanto, devido a problemas técnicos, houve uma perda de 7% das amostras. Como resultado, o estudo incluiu 66 mulheres na pré-menopausa distribuídas em dois grupos: A, controle (fibroadenoma, n = 36) e B, estudo (câncer, n = 30). Mulheres na pré-menopausa com níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) <30 mUI / ml, fibroadenoma de mama ou carcinoma de mama e sem tratamento oncológico prévio foram incluídos no estudo. Pacientes com fibroadenoma foram submetidos a análise histológica dos tumores para confirmar seu estado benigno antes da imunohistoquímica.

IMUNOHISTOQUÍMICA DA METALOTIONEÍNA

Amostras de tecido mamário fixadas em formalina tamponada foram cortadas em seções de 3 µm de espessura. As secções foram desparafinadas em xilol durante 5 minutos, desidratadas em etanol absoluto, foram lavadas em solução salina tamponada a pH 7,4 durante 5 min e depois tratou-se durante 5 min com peróxido de hidrogênio a 3% (H_2O_2) em solução tamponada para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em prateleiras contendo 0,21% de ácido cítrico (pH 6,0) e aquecidas em forno de microondas durante 15 minutos na potência máxima.

As lâminas foram arrefecidas e adicionou-se solução salina tamponada

com fosfato durante um período de arrefecimento de 20 minutos. As amostras de tecido foram incubadas durante a noite a 4-8 ° C com anticorpo policlonal metalotioneína. O anticorpo policlonal anti-MT-1 (anti-metalotioneína policlonal de coelho - Número de Catálogo biorbyt-orb11042) foi utilizado numa diluição de 1: 100.

As lâminas foram enxaguadas com PBS-Tween, instiladas com reagente secundário (anti-murganho BA 2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem novamente com PBS-Tween, as lâminas foram instiladas com o sistema de detecção ABC Elite (PK 6100, Vector Laboratories) e incubadas durante 45 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram enxaguadas mais uma vez com PBS-Tween, instiladas com DAB (1,0 ml de EnVision FLEX DAB para uma gota de cromógeno) e incubadas durante 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água destilada, contrastadas com hematoxilina, coradas com solução amoniacal, desidratadas com etanol absoluto, passadas através de frascos de Coplin contendo xilol e montadas em resina de Permount. As células que expressam a proteína metalotioneína foram identificadas por coloração castanha escura no núcleo e no citoplasma.

MÉTODO QUANTITATIVO

Dois observadores, cegos para a identidade do paciente e que anteriormente desconheciam qualquer um dos casos, realizaram quantificação da expressão protéica usando um microscópio de luz (Eclipse E-400, microscópio óptico, Nikon, Tóquio, Japão) conectado a uma câmera de vídeo colorida (CHC-370 N câmera digital, Samsung, Seul, Coréia do Sul), onde a imagem foi capturada e transmitida para um computador equipado com o programa Imagelab, versão 2.3 (Softium Informatica, São Paulo, Brasil) para análise de imagens.

Para determinar a expressão de metalotioneína-1, os núcleos de células coradas foram contados ao microscópio com uma ampliação de 400X. Pelo menos 500 células do epitélio mamário foram contadas em cada lâmina, em campos aleatórios, iniciando na área de maior concentração de MT no núcleo da célula, utilizando Software de Processamento e Análise de Imagens -

Imagelab® (SOFTIUM Informatica LTDA, São Paulo, Brasil).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas deste estudo foram realizadas utilizando o software R, versão 3.2.2. Os dados foram expressos em freqüências, porcentagens, medidas de tendência central e dispersão. A normalidade dos dados foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a homogeneidade dos dados, foi utilizado o teste de Levene. Para comparar mais de duas médias entre dados normais e homogêneos, foram utilizados o teste t de Student e o teste ANOVA. Níveis significativos foram estabelecidos com valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Na microscopia óptica, as células do câncer de mama tiveram maior concentração de núcleos corados com anti-MT-1 quando comparados ao fibroadenomas (fig. 1). As características dos dois grupos foram semelhantes, exceto para idade e circunferência da cintura (Tabela 1).

Tabela 1 Características dos pacientes na amostra do estudo

Características	Grupo A (controle) (n = 36) Media± DP	Grupo B (Estudo) (n=30) Media± DP	p
Idade (anos)	32,92 ± 9,46	40,37 ± 6,77*	0,0011
Menarca (anos)	12,86 ± 1,16	13,67 ± 1,79	0,0820
CC (cm)	79,40 ± 12,34	83,92 ± 8,92*	0,0480
IMC (kg/m²)	24,20 ± 4,61	25,70 ± 3,62	0,1540

*A média dos casos no grupo B foram maior estatisticamente significante quando comparado ao grupo A.

A análise quantitativa mostrou porcentagens médias de núcleos corados com metalotioneína por 500 células epiteliais de mama em mulheres: 9,10 ±

5,90 e 26,93 ± 15,87 nos grupos A (controle) e B (câncer de mama), respectivamente (Tabela 2). Além disso, uma maior expressão de metalotioneína foi demonstrada no núcleo de tumores histológicos de grau 3, quando comparado com tumores de grau 1, com p <0,05 (Figura. 2).

Tabela 2. Percentagem média de núcleos de metalotioneína por 500 células nos grupos controle e estudo.

Grupo	n	Media (%)	SD
Grupo A (Fibroadenoma)	36	9,10	5,90
Grupo B (Cancer de mama)	30	26,93*	15,87

* A porcentagem de casos com células positivas para metalotioneína no grupo B foi estatisticamente significativamente maior em comparação ao grupo A (p<0,001).

A expressão de MT-1 foi estatisticamente significativa em câncer de mama negativo para HER2-, estrogênio e receptores de progesterona em comparação com tumores positivos para esses receptores de hormônios (p <0,05) (Tabela 3).

Tabela 3. Expressão média da metalotioneína-1 em tumores positivos / negativos para ER, PR e Her2

Tipo de Receptores	**Positivo Média ± DP**	**Negativo Média ± DP**	**p valor***
ER	23,61±15,97	30,24±30,24	0,001
PR	23,12±13,45	31,91±17,88	0,001
HER2	25,97±14,22	27,16±16,53	0,007

* Teste ANOVA.

DISCUSSÃO

Metalotioneinas participam da carcinogênese por mecanismos promotores do desenvolvimento de células tumorais mais resistentes à quimioterapia ou radioterapia [15]. Níveis elevados desta proteína, com o seu efeito antioxidante, podem proteger as células cancerígenas contra os danos causados pelos radicais livres. Esta proteína tem efeitos antiapoptóticos e pró-proliferativos, que apoiam o crescimento celular descontrolado no câncer de mama [18-20].

Há evidências acumuladas de que a metalotioneína é um biomarcador imunohistoquímico devido à sua elevada expressão em células mioepiteliais do carcinoma invasivo da mama [12]. No entanto, poucos estudos tentaram elucidar o comportamento dessa proteína no fibroadenoma, um tumor benigno que não aumenta o risco de desenvolver câncer de mama [13], e essa característica torna essa condição um controle ideal para determinar o efeito da expressão da metalotioneína no prognóstico em câncer de mama.

No presente estudo, a superexpressão de metalotioneína-1 foi observada em células de tecidos de câncer de mama em relação àquelas em células de tecidos fibroadenoma. Com base em nossa pesquisa bibliográfica, apenas El Sharkawy e Farrag [14] investigaram a expressão de metalotioneína em fibroadenomas de mama humanos. Segundo esses autores, a maior expressão de MT-1 está relacionada ao comportamento mais agressivo do tumor no carcinoma ductal de mama. Outros autores forneceram confirmação adicional de que uma maior expressão nuclear de MT-1 é mais freqüentemente observada em carcinomas do que em tumores benignos [15, 21].

Além disso, vale ressaltar que houve diferença significativa entre a média de idade dos pacientes com câncer de mama e fibroadenoma de mama. No entanto, fibroadenomas são conhecidos por serem mais comuns em mulheres mais jovens, enquanto o câncer de mama ocorre mais freqüentemente em mulheres mais velhas [22]. A circunferência da cintura foi maior em mulheres com câncer, consistente com a literatura, uma vez que mulheres na pré-menopausa com excesso de gordura visceral têm um risco maior de desenvolver câncer de mama triplo negativo, que tem um prognóstico relativamente pior [23].

Agresti et al. [24] observaram que pacientes com sobrepeso na pré-menopausa tinham maior risco de desenvolver câncer de mama triplo-negativo do que mulheres na menopausa. Esses achados sugerem que a obesidade pode ter um papel nos mecanismos biológicos subjacentes aos tipos mais agressivos de câncer de mama e à maior expressão da metalotioneína [25].

Com base em alguns autores, a expressão elevada de MT bloqueia a apoptose celular por meio do sequestro de íons de zinco que estabilizam a p53, um gene que age como um supressor de tumor por induzir a apoptose. Assim, o MT permite a manutenção e integridade do genoma [26]. Estudos recentes indicam uma forte relação entre p53 e MT, onde a superexpressão de metalotioneína está consistentemente associada à presença de p53 mutante e, no câncer de mama, essa relação tem sido associada a um menor número de células apoptóticas e pior prognóstico [27].

O grau histológico do tumor está associado à imunorreatividade da metalotioneína no câncer de mama, além de seus efeitos antiapoptóticos. Esta descoberta é consistente com observações anteriores em carcinomas invasivos de mama e tumores in situ relatados por outros pesquisadores [10,12]. O presente estudo mostrou uma diferença significativa na expressão de MT-1 de acordo com o grau histológico do tumor. Os tumores de grau 3 têm uma maior positividade para a proteína MT-1, assim como para o câncer de mama com superexpressão de HER2 e receptores hormonais negativos. A associação entre essas variáveis é relevante, indicando que a metalotioneína tem um papel na diferenciação, proliferação e progressão dos cânceres de mama. A proliferação é um guia importante para o prognóstico e terapia de tumores malignos [28,29].

Portanto, estudos indicaram que a expressão de proteínas MT no câncer de mama ductal pode representar um índice prognóstico desfavorável, uma vez que sua maior expressão está relacionada a células malignas com maior grau histológico. No entanto, há uma necessidade de mais estudos para obter uma melhor compreensão do comportamento da metalotioneína-1 na tumorigênese e para definir o significado clínico de sua expressão em tumores malignos e benignos da mama.

APROVAÇÃO ÉTICA

A diretoria interna de revisão da Universidade Federal do Piauí aprovou este protocolo. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes individuais incluídos no estudo. Todos os procedimentos realizados neste estudo cumpriram as leis brasileiras vigentes e estavam de acordo com os padrões éticos dos comitês de pesquisa institucionais e nacionais, assim como a declaração de Helsinque de 1964 e suas posteriores alterações.

INFORMAÇÃO DE FINANCIAMENTO

Este estudo não teve financiamento.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

REFERENCES

1 Torre L.A, Bray F, Siegel R.L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J & Jemal A. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. **65**, 87-108 (2015).

2 Ferlay J, Soer jomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer.**136,** 359**-**386 (2015).

3 National Cancer Institute (INCA). Cancer estimates for 2018 in Brazil. http://www.inca.gov.br/estimate/2018.

4 Anderson KN, Schwab RB & Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. Breast Cancer Res Treat.**144**,1-10(2014).

5 Dowset M, Smith I.E, Ebbs S.R, Dixon J.M, Skene A. Proliferation and apoptosis as markers of benefit in neoadjuvant endocrine therapy of breast cancer. Clin. Cancer Res.**12**, 1024s-1030s (2002).

6 Duffy M.J, O'Donovan N, McDermott E, Crown J. Validated biomarkers: The key to precision treatment in patients with breast cancer. The Breast. **29**,192-201 (2016).

7 Ikink G.J, Boer M,Elvira R. M, Zwaagstra, A.B, Klijn, C, Hoeve et al. Insertional mutagenesis in a HER2-positive breast cancer model reveals ERAS as a driver of cancer and therapy resistance. Oncogene.**1**, 1-16 (2018).

8 Fan L.Z & Cherian M.G. Potential role of p53 on Metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. British Journal of Cancer.**87**, 1019-1026 (2002).

9 Lai Y, W-c yip G & Bay B.H. Targeting metallothionein for prognosis and treatment of breast cancer. Recent patents on anti-cancer drug Discovery. **2**,178-185 (2011).

10 Bizón A, Jedryczko K & Milnerowicz H. Rola metalotioneiny w procesie nowotworzenia oraz w leczeniu chorób nowotworowych.Postepy Hig Med Dosw **71**, 98-109 (2017).

11 Gomulkiewicz A, Jab lonska K.L, Pula B.Z, Grzegrzolka J, Borska S, Podhorska M.O.W, Wojnar A et al. Expression Of Metallothionein 3 In Ductal Breast Cancer. International Journal Of Oncology. **49**, 2487-2497 (2016).

12 Gallicchio L.M, Flaws, J.A., Fowler, B.A, Ioffe, O.B. Metallothionein expression in invasive and in situ breast carcinomas. Cancer Detection and Prevention. **29**, 332-337 (2005).

13 Shaik A.N, Ruterbusch J.J, Abdulfatah E, Shrestha R, Fayez Daaboul M.H.D, Pardeshi V, et al. Breast fibroadenomas are not associated with increased

breast cancer risk in na African American contemporary cohort of women with benign breast disease. Breast cancer Ressearch. **20**,1-8 (2018).

14 El Sharkawy S.L & Farrag A.R.H. Mean Nuclear Area and Metallothionein Expression in Ductal Breast Tumors: Correlation With Estrogen Receptor Status. Immunohistochemistry & Molecular Morphology.**16**,108-112 (2008).

15 Gumulec J, Raudenska M, Adam V, Kizek R, Masarik M. Metallothionein - Immunohistochemical Cancer Biomarker: A Meta-Analysis. Plosone. **9**, e85346-e85350 (2014).

16 Wojtczak B, Pula B., Gomulkiewicz A, Olbromski M, Podhorska-Okolow M, Domoslawski P & Dziegiel P. Metallothionein Isoform Expression in Benign and Malignant Thyroid Lesions. Anticancer research. **37**, 5179-5185 (2017).

17 Huang J, Ang L, Liu M.Q, Hu H.G., Wang J, Zou Q & Wu Z.S. Serum and tissue expression of gelatinase and Twist in breast cancer. Eur Rev Med Pharmacol Sci. **18**, 2662-2669 (2014).

18 Cherian M.G, Jayasurya A & Bay B.H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. **533**, 201-209 (2003).

19 Jin R, Bay B.H &Tan P.H. Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. Breast Cancer Res Treat **66,** 265–72 (2006).

20 Tai S.K, Tan O.J.K, Chow V.T.K, Jin R, Jones J.L, Tan P.H & Bay B.H. Differential expression of metallothionein 1 and 2 isoforms in breast cancer lines with different invasive potential: identification of a novel nonsilent metallothionein-1H mutant variant. The American journal of pathology .**163**, 2009-2019 (2003).

21 Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins J.E & Fuentealba IC. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. Journal of comparative pathology .**125**,130-136 (2001).

22 Sönmez K, Türkyilmaz Z, Karabulut R, Demirogullari B, Özen I.O, Moralioglu S, Kale N. Surgical breast lesions in adolescent patients and a review of the literature. Acta Chirurgica Belgica.**106**, 400-404 (2006).

23 Fagherazzi G, Chabbert-Buffet N, Fabre A, Guillas G, Boutron-Ruault MC, Mesrine S & Clavel-Chapelon F. Hip circumference is associated with the risk of premenopausal ER−/PR− breast cancer. International journal of obesity **36**,431-439 (2012).

24 Papa A.M, Pirfo C.B, Murad A.M, et al. Impact of obesity on the prognosis of breast cancer. Rev Bras Onc Clín. **9**, 25-30 (2013).

25 Agresti R, Meneghini E, Baili P, Minicozzi P, Turco A, Cavallo I. et al. Association of adiposity, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study.Breast Cancer Res Treat. **157**, 179-189 (2016).

26 Chen X, Lu W, Zheng W, Gu K, Chen Z, Zheng Y & Shu X. O. Obesity and weight change in relation to breast cancer survival. Breast cancer research and treatment **122,** 823-833 (2010).

27 Ostrakhovitch E.A, Olsson P.E, Jiang S & Cherian M.G. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. FEBS letters. **580**, 1235-1238 (2006).

28 Ostrakhovitch E.A, Song Y.P & Cherian M.G. Basal and copper-induced expression of metallothionein isoform 1, 2 and 3 genes in epithelial cancer

cells: The role of tumor suppressor p53. *Journal* of Trace Elements in Medicine and Biology. **35,** 18-29 (2016).

29 Ostrakhovitch E.A, Olsson P.E, von Hofsten J & Cherian M.G. P53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells. Journal of cellular biochemistry **102,**1571-1583 (2007).

30 Gomulkiewicz A, Podhorska-Okolow M, Szulc R, Smorag Z, Wojnar A, Zabel M & Dziegiel, P. Correlation between Metallothionein (MT) expression and selected prognostic factors in ductal breast cancers. Folia Histochemica et Cytobiologica **48**, 242-248 (2010).

31 Sens M.A, Somji S, Garrett S.H, Beall C.L & Sens D.A. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. The American journal of pathology. 159, 21-26 (2001).

32 Chandler P, Kochupurakkal B.S, Alam S, Richardson A.L & Soybel D.I, Kelleher SL. Subtype-specific accumulation of intracellular zinc pools is associated with the malignant phenotype in breast cancer. Molecular cancer.**15**, 2-19 (2016).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pacientes que participaram do presente estudo e ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Piauí, Brasil.

Contribuição dos autores:

“Sampaio FA, Martins LM, Escórcio CSD, Revoredo CM e Costa-Silva, DR” conceberam e projetaram o estudo e escreveram a versão final do manuscrito. “Alves, VO, Alves-Ribeiro, FA e da Silva BB” foram responsáveis pela

realização do estudo, analisando estatisticamente os dados e redigindo e revisando o manuscrito. Todos os autores revisaram o manuscrito.

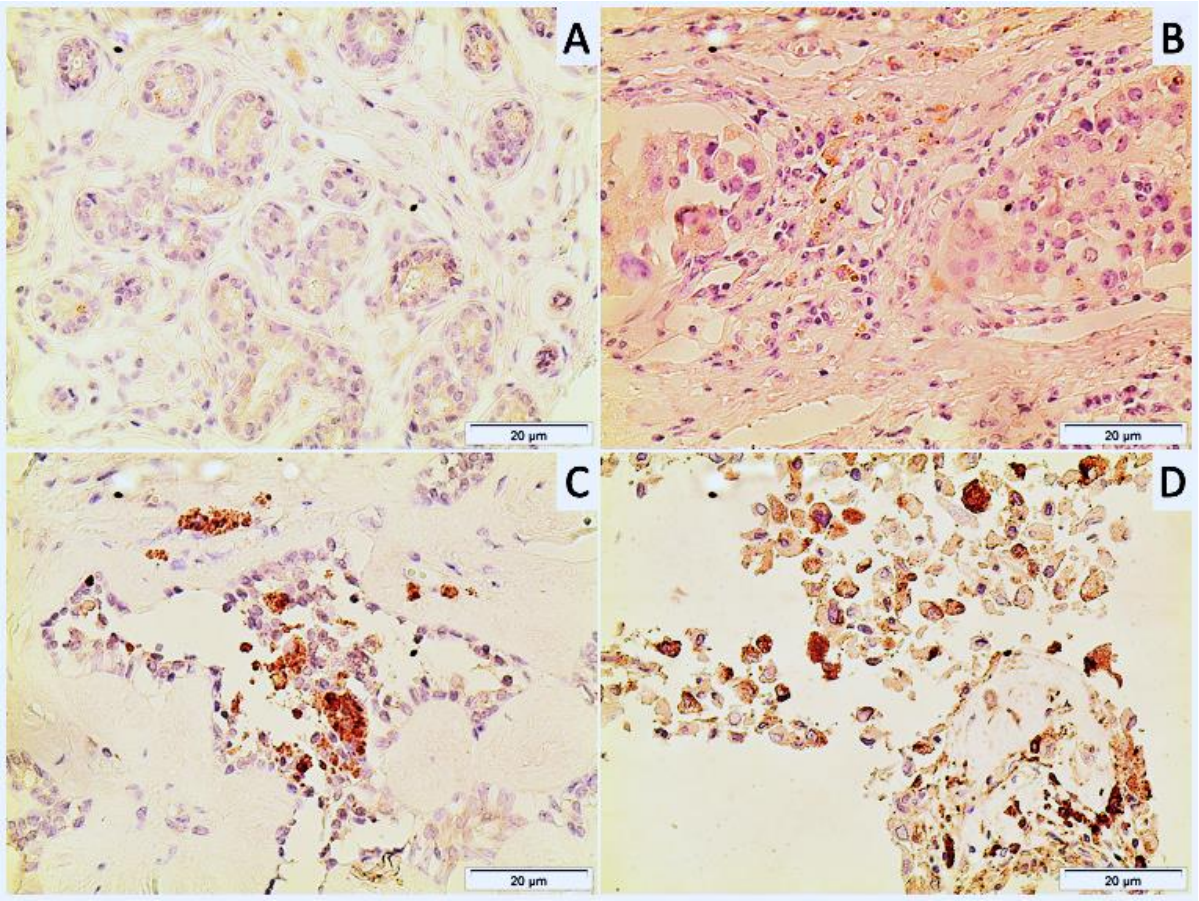


Figura 1. Fotomicrografias de cortes histológicos de fibroadenoma de mama (A), carcinoma de mama grau 1 (B), carcinoma de mama grau 2 (C) e carcinoma de mama grau 3 (D). Observe a maior concentração de núcleos corados com MT-1 nas células do carcinoma de mama em comparação com as células do fibroadenoma (aumento original de X400).

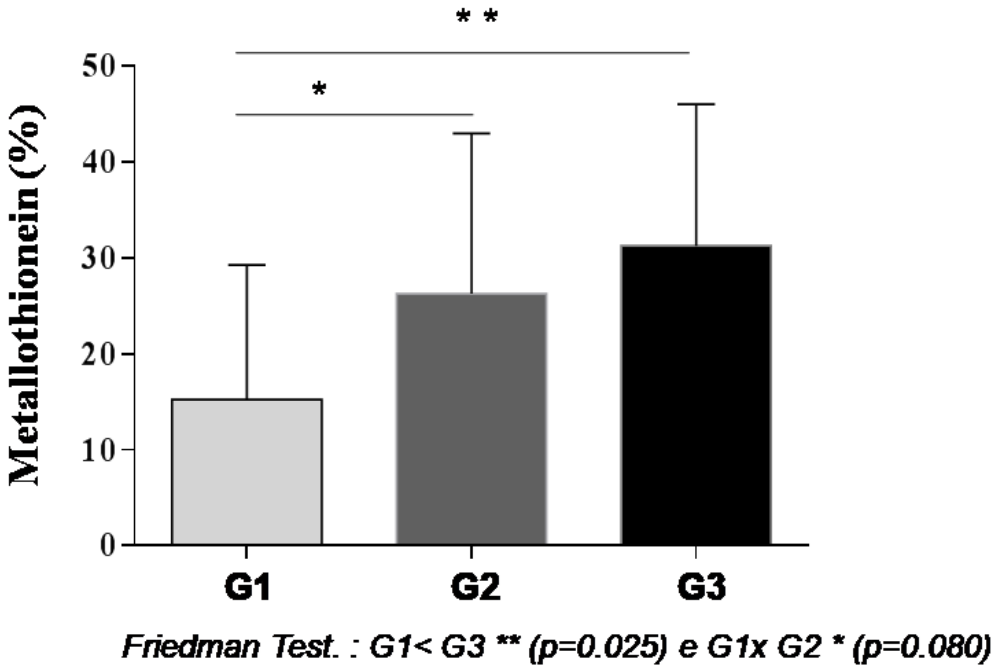


Figura 2. Expressão de MT-1 em diferentes graus histológicos de carcinoma invasivo ductal

4.CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metalotioneína, em particular sua isoforma metalotioneína-1, tem sido associada a maior proliferação, redução da apoptose de células malignas e pior prognóstico. Todavia, dentre os estudos consultados na literatura, apenas o de Sharkway e Farrag (2008) mostrou a comparação da expressão imunohistoquímica da MT entre o carcinoma ductal invasivo e o fibroadenoma mamário. Contudo, o nosso estudo foi o primeiro a avaliar a expressão da isoforma 1 da metalotioneína (MT-1) em carcinoma ductal invasivo e fibroadenoma. O presente estudo avaliou a expressão da MT-1 em 66 pacientes, fibroadenoma (controle, n=36) e carcinoma ductal invasivo (estudo, n=30). Os nossos resultados mostraram uma expressão da MT-1 significantemente maior em carcinoma mamário ductal invasivo do que em fibroadenoma mamário e também teve uma maior significância estatística nos carcinomas mais agressivos como os poucos diferenciados (grau 3) e os subtipos moleculares triplo negativo, enfatizando o seu papel na progressão e agressividade do carcinoma ductal invasivo de mama.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.
Pesquisador: benedito borges da silva
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 43447015.8.0000.5214
Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.022.962
Data da Relatoria: 15/05/2015

Apresentação do Projeto:
O projeto apresenta uma proposta de pesquisa de Mestrado intitulada: " Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária". Justifica a relevância da investigação devido a necessidade de identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas, utilizados como fatores prognósticos das neoplasias mamárias como elemento facilitador do entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação, a diferenciação e o desenvolvimento de metástases tumorais. Inicialmente os marcadores tumorais eram identificados por meio de técnicas moleculares ou bioquímicas.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo Primário: Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.
Objetivo Secundário: Expressão imunoistoquímica das metaloproteinases 2 e 9 na neoplasia mamária; Avaliar as concentrações plasmáticas de metaloproteinases 2 e 9; Determinar as concentrações plasmáticas e eritrocitárias de zinco• Analisar o consumo alimentar e adequação da dieta em relação à macronutrientes e zinco; Avaliar a associação entre as metaloproteinases 2 e 9 com parâmetros de zinco; Correlacionar o polimorfismo do receptor
do fator de crescimento epidérmico e os subtipos moleculares de câncer de mama; Relacionar os dados antropómetricos com subtipos moleculares de câncer de mama.

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Quanto aos riscos o pesquisador diz no Protocolo que: "Não há nenhum risco aos participantes da pesquisa". No entanto no TCLE afirma que "Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, [...] adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade". Sendo o TCLE o documento de acesso aos participantes a descrição dos riscos foi considerada.

Benefícios:

Os participantes da pesquisa receberão uma orientação nutricional de acordo com as necessidades após todas as coletas de dados; Bem como receberão todos os resultados referente as análises realizadas durante a pesquisa. Acrescentando, ainda no TCLE que; "As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentacão".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Caracteriza-se como um estudo quantitativo do tipo grupo controle, para identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese como candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. A população será constituída de pacientes portadoras de câncer de mama, atendidas no Setor de Mastologia da Clinica Ginecológica do Hospital Getúlio Vargas (lócus da investigação), no período de julho de 2015 a julho de 2018 que serão submetidas a tratamento especializado. Do universo populacional será selecionado o grupo controle constituído por 40 pacientes portadoras de fibroadenoma. Define como critérios de inclusão serem pacientes portadoras de câncer de mama, comprovado histológicamente; Mulheres com idade maior que 20 anos sem qualquer tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico. Como critério de Exclusão: ter sido submetida a tratamento prévio quimio, hormônio ou radioterápico; Mulheres com idade menor que 20 anos; Mulheres que não aceitaram participar do estudo; Mulheres com uso de suplementos alimentares. Para a coleta

de dados serão realizados os seguintes procedimentos: Anteriormente a coleta de sangue, o peso corporal será determinado utilizando uma balança digital Filizola®,com capacidade máxima de 150 kg, graduada em 100 gramas. A estatura será medida com um antropômetro marca Secar, graduado em centímetros e com barra de madeira vertical e fixa. O peso e a estatura serão medidos três vezes para cada participante, sendo então obtida a média dessas medidas.O índice de massa corpórea será calculado a partir do peso da participante do estudo dividido pela sua estatura elevada ao quadrado (WHO, 2000). A medida da circunferência da cintura será realizada com as mulheres em pé, utilizando uma fita métrica não extensível,circundando a linha natural da cintura, na região mais estreita entre o tórax e o quadril, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Para a avaliação do consumo alimentar será utilizado um inquérito alimentar realizado de acordo com a técnica de registro alimentar de três dias,
compreendendo dois dias durante a semana e um dia no final de semana.O consumo alimentar de macronutrientes e zinco será calculado pelo software Nutwin, versão 1.5 do Departamento de Informática em Saúde da Universidade Federal de São Paulo (ANÇÃO et al., 2002). Para verificar a adequação da ingestão alimentar de zinco das participantes do estudo, será utilizado como referência a Estimated Average Requirement (EAR),contida nas DRI's (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001).Amostras de 20 mL de sangue venoso serão coletadas no período de 7:30 às 8:30 horas,estando as participantes da pesquisa em jejum de no mínimo 12 horas. O sangue colhido será distribuído em tubo contendo citrato de sódio a 30% como anticoagulante (10 L/mL de sangue) para a análise de zinco (10 mL),tubo contendo EDTA para análise das metaloproteinases 2 e 9 (5 mL) e para análise do receptor do fator de crescimento epidérmico (5 mL).O plasma será separado do sangue total por centrifugação a 1831xg durante 15 minutos a 4ºC, sendo o mesmo extraído com pipeta automática, acondicionado em tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e armazenado em freezer a –20°C. Para separação dos eritrócitos será utilizado o método proposto por Whithehouse et al. (1982). A massa eritrocitária será lavada com 5mL de solução salina isotônica 0,9%, sendo então homogeneizada lentamente por inversão e centrifugado a 2493xg
por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado. O procedimento descrito será realizado três vezes, para remover contaminantes dos eritrócitos. Após a última centrifugação, a solução salina será aspirada, descartada e a massa eritrocitária será cuidadosamente extraída com o auxílio de uma pipeta automática, transferida para tubos eppendorfs de polipropileno desmineralizados e mantidos à temperatura de –20°C para
análise de zinco e hemoglobina.As pacientes serão submetidas a procedimento cirúrgico especializado para confirmação histológica do tumor, exérese dos tumores benignos

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI

Continuação do Parecer: 1.022.962

(fibroadenoma) e biópsia (Core biospy) das neoplasias malignas. A seguir, as amostras de tumor serão fixadas em formalina e emblocadas em parafina para confirmação diagnóstica. Para tal, as amostras serão então fixadas em formol tamponado, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas pelo xilol e impregnadas pela parafina numa estufa a temperatura de 59 º C (MASSON, 1956). Após este processo,parte da amostra será submetida a cortes seriados consecutivos e corados com hematoxilina-eosina. O bloco será então armazenado para posterior avaliação imunoistoquímica.A análise das metaloproteinases será realizada com base na plataforma Human MMP Panel 2 Magnetic Bead Kit (HMMP2MAG-55K).
Analise dos dados: Para a comparação dos grupos estudados quanto às variáveis envolvidas neste estudo, será realizado o teste t de Student, aplicada uma ANOVA – análise de variância, seguida do teste de Tukey para identificar as possíveis diferenças nas comparações entre os grupos. A diferença considerada significativa será quando p0,05 e intervalo de confiança adotado será de 95%. Na análise das variáveis possivelmente inter-relacionadas será utilizado o coeficiente de Pearson.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
A proposta apresenta os componentes básicos exigidos por uma pesquisa acadêmica, referencial teórico que dará sustentação ao estudo, bem como os aspectos éticos do estudo, cronograma e orçamento afirmando ser financiada com recursos próprios. Os objetivos estão coerentes com a proposta de estudo. O coordenador é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da Resolução CNS nº 466/12 - e zelar pela privacidade e confidencialidade dos dados.

Recomendações:
Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Sem pendências

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

ANEXO B-Comprovante de Submissão do Artigo Científico originado da Tese

ESTUDO CASO-CONTROLE DA EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA NO CÂNCER DE MAMA E FIBROADENOMA

Artigo aceito pelo Scientifc Reports após correções recomendadas pelos revisores

ISSN: 0163-4984 (Print), 1559-0720 (Electronic)

QUALIS: A1 em Biotecnologia

JCR 2016/2017: 4.122

Reviewer comments:

Reviewer #1 (Remarks to the Author):

Reviewer comments for manuscript number SREP-18-33587A

The Authors took into account the most of my previous comments. However, the manuscript is still written very carelessly, it still contains numerous editorial errors, such as lack of spaces between words (e.g. page 2, lines 6, 8, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 21; page 4, lines 3, 4, 5, 15, 17; page 5, lines 8, 10, 17, page 6, lines 9, 10, 13, 21, and so on)

The text of the entire manuscript still requires a detailed linguistic and editorial correction.

Reviewer #2 (Technical Comments to the Author):

The authors have revised the manuscript and it is acceptable for publication.

Reviewer #2 (Remarks to the Author):

There are grammatical errors that need to be addressed.

manuscripttracking**system** SCIENTIFIC REPORTS

tracking system home | author instructions | reviewer instructions | help | tips | logout | journal home

Detailed Status Information

Manuscript #	SREP-18-33587B
Current Revision #	2
Other Versions	SREP-18-33587-T SREP-18-33587A
Submission Date	17th April 19
Current Stage	Quality Check Started
Title	A case-control study of Metallothionein-1 expression in breast cancer and breast fibroadenoma
Manuscript Type	Original Research
Collection	N/A
Corresponding Author	Dr. Fabiane Sampaio (fabianesampaio21@gmail.com) (Universidade Federal do Piaui)
Contributing Authors	Prof. Luana Martins , Prof. Carla Solange Dourado , Dr. Camila Maria Revoredo , Dr. Danylo Costa-Silva , Prof. Victor de Oliveira , Prof. Francisco Alves-Ribeiro , Prof. Benedito da Silva
Authorship	Yes
	The overexpression of Metallothionein-1 (MT-1) may play an important role in breast cancer; however, few studies have compared MT-1 expression between breast cancer and fibroadenoma. A cross-sectional controlled study was performed in 66 premenopausal women, aged 20-49 years, who had been histologically diagnosed with breast fibroadenoma or breast cancer. The patients were divided into two groups: group A, control (fibroadenoma, n=36) and group B, study (breast cancer, n=30). Immunohistochemistry was performed on tissue samples of fibroadenoma and breast

ANEXO C-Comprovante de Submissão do Artigo Científico originado da Tese

INFLUÊNCIA DA METALOTIONEÍNA NO CONTEÚDO DE ZINCO E NA ATIVIDADE DA P53 NO CÂNCER DE MAMA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA



Artigo submetido para o periódico Biometals

Journal ISSN: 0966-0844 (Print), 1572-8773 (Online)

JCR 2017/2018: 2.478

QUALIS CAPES: B1 em Biotecnologia

Biometals (BIOM) <em@editorialmanager.com> qua, 17 de abr 09:56 (há 1 dia)

para eu

inglês › português Traduzir mensagem Desativar para: inglês ×

Dear MSc. Sampaio,

Thank you for submitting your manuscript, Influence of Metallothionein on Zinc content and p53 Activity in Breast Cancer: A Systematic Review, to BioMetals.

The submission id is: BIOM-D-19-00101
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal web site:

Your username is: fabianesampaio
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at https://www.editorialmanager.com/biom/

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Resolução CNS 466/12, item II.2 considera como pesquisa em seres humanos as realizadas em qualquer área do conhecimento e que, de modo direto ou indireto, envolva pessoas ou coletividades, em sua totalidade ou partes, incluindo o manejo de informações e materiais. Assim, também são consideradas pesquisas envolvendo seres humanos as entrevistas, aplicações de questionários, utilização de bancos de dados e revisões de prontuários. Portanto, em consonância com esta resolução este projeto será submetido ao parecer da Comissão de Ética da UFPI, como também serão respeitados todos os direitos dos pacientes ao anonimato e à autonomia. Será utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual o responsável pelo paciente autorizará ou não a sua participação no projeto.

Assim, você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS**:**

Justificativa: As neoplasias mamárias estão entre as maiores causas de morte de mulheres no Brasil. Portanto, um caminho para diminuição dessa mortalidade é a contínua busca por novos biomarcadores ou modelos de estágios que possam ajudar a prever a evolução clínica da doença, ou simplesmente melhorar a terapia. A este respeito, a identificação de substâncias relacionadas à carcinogênese são candidatos naturais para explorar novos fatores prognósticos ou alvos potenciais para terapias específicas. O **objetivo** desse projeto é Avaliar os biomarcadores moleculares em mulheres com neoplasias mamárias.

Procedimentos:A voluntária será submetida à coleta de sangue venoso para exames bioquímicos e análise de biomarcadores moleculares, será determinado o consumo alimentar por meio de registros alimentares. Não será realizada entrevista gravada ou filmada, aceitando participar da pesquisa você terá garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos resultados durante todas as fases da pesquisa.

DESCONFORTOS E RISCOS: Riscos: Como durante a pesquisa será aplicado um questionário, este poderá ocasionar um risco de constrangimento, mas as pesquisadoras responsáveis, Carla Solange de Melo E. Dourado e Luana Mota Martins adotarão procedimentos éticos no decorrer dessa aplicação conforme Resolução 466/2012 para evitar esse risco. Ao participar da pesquisa, a voluntária não sofrerá nenhum prejuízo; no entanto, poderá sentir leve desconforto em vista da coleta do material biológico, requerido para realização desta pesquisa. No entanto providências e cautelas serão empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, após a coleta de sangue será oferecido um lanche patrocinado pelos pesquisadores. Ratificamos que nenhum dos

procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Não há riscos diretos aos participantes. **Benefícios**: As participantes do estudo terão como benefícios os resultados dos exames referente aos biomarcadores moleculares, que serão fornecidos após a realização dos mesmos, bem como receberão uma orientação nutricional, proporcionando uma orientação da melhor alimentacão. **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO**: Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada na Universidade Federal do Piauí e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELA PARTICIPANTE: Eu, _____ fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador certifica-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei localizar o professor orientador **Benedito Borges da Silva**no seguinte endereço**:** Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Saúde. Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP 64049-550 Teresina, PI. Telefone: (86) 3215-5160 ou o Comitê de Ética em Pesquisa se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa/UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP 64049-550

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

FICHA DE CADASTRO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

GRUPO:

IDENTIFICAÇÃO:

Nome:_____ Data: ____/____/____
DN:___/___/___ Idade:_____anos Sexo:_____
Endereço:_____
Bairro:_____Cidade:_____Tel:_____Cel:_____Escolaridade:_
_____ Ocupação:_____
Número de pessoas em casa:_____

HISTÓRIA CLÍNICA:

1. Fumantes: Sim ( ) Não ( ) b) Uso de medicamentos: Sim ( ) Não ( )
   Quais?_____
2. Consumo de Bebidas alcoólicas: Sim ( ) Não ( ) Frequência? _____
3. Uso de Suplementos Nutricionais: Sim ( ) Não ( ) Quais? _____
4. Idade da Menarca:_____
5. Idade da Menopausa:_____
6. Antecedentes Familiares de Câncer: Sim ( ) Não ( ) Qual ?
7. Diagnóstico de câncer de mama positivo ou negativo:___ Quanto tempo:___
8. Qual o estágio da doença?_____
9. Tamanho do Tumor:_____
10. Classificação do Tumor:_____
11. Presença de doenças: Sim ( ) Não ( ) Qual ?
    Diabetes ( ) Hipertensão ( ) Dislipidemias ( ) Doenças Cardiovasculares ( ) Alterações na Tireóide ( ) Doenças Hepáticas ( )
    Outras:_____

PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS:

Peso: ---------- kg IMC: ----------kg/m^2 Altura: ---------- m Circunferência da Cintura:- ------- cm Estado Nutricional:----------

EXAME HISTOQUÍMICO: